

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2001-503785  
(P2001-503785A)

(43) 公表日 平成13年3月21日 (2001.3.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	
31/047		31/047	
31/223		31/223	
31/337		31/337	
31/366		31/366	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 294 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-524997  
(86) (22) 出願日 平成9年12月2日 (1997.12.2)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年6月2日 (1999.6.2)  
(86) 国際出願番号 PCT/CA97/00910  
(87) 国際公開番号 WO98/24427  
(87) 国際公開日 平成10年6月11日 (1998.6.11)  
(31) 優先権主張番号 60/032, 215  
(32) 優先日 平成8年12月2日 (1996.12.2)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 60/063, 087  
(32) 優先日 平成9年10月24日 (1997.10.24)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 アンジオテック ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド  
カナダ国 ブイ6ティー 1ゼット4 プリティッシュ コロンビア, バンクーバー, エヌ. ダブリュー. マリン ドライブ 6660  
(72) 発明者 ハンター, ウィリアム エル.  
カナダ国 ブイ5ケイ 3エル7 プリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ペンティクトン ストリート 525  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患を処置または予防するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、乾癬または多発性硬化症のような炎症性疾患を処置または予防するための方法であって、炎症部位に抗微小管剤またはそのアナログもしくは誘導体を送達する工程を包含する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. 多発性硬化症を処置または予防するための方法であって、該多発性硬化症が処置または予防されるように、患者に治療有効量の抗微小管剤を投与する工程を包含する方法。
2. 前記抗微小管剤が、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス- (スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
3. 前記抗微小管剤がパクリタキセル、またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項1に記載の方法。
4. 乾癬を処置または予防するための方法であって、該乾癬が処置または予防されるように、患者に治療有効量の抗微小管剤を投与する工程を包含する、方法。
5. 前記抗微小管剤が、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス- (スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項4に記載の方法。
6. 前記抗微小管剤が局所的に投与される、請求項5に記載の方法。
7. 関節炎を処置または予防するための方法であって、該関節炎が処置または予防されるように、患者に治療有効量の抗微小管剤を投与する工程を包含し、ただし、該抗微小管剤は、パクリタキセル、またはそのアナログもしくは誘導体ではない、方法。
8. 前記抗微小管剤が、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス- (スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

9. 前記抗微小管剤が、全身的または関節内に投与される、請求項7に記載の方法。

10. 狭窄を処置するための方法であって、該狭窄が処置または予防されるように、患者に治療有効量の抗微小管剤を投与する工程を包含し、ただし、該抗微小管剤は、パクリタキセル、またはそのアナログもしくは誘導体ではない、方法。

11. 前記抗微小管剤が、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

12. 前記抗微小管剤が、全身的または血管周辺に投与される、請求項10に記載の方法。

13. 前記抗微小管剤が、医療用デバイス上のコーティングとして投与される、請求項10に記載の方法。

14. 前記医療用デバイスが、ステント、ステント移植片、血管移植片、または留置カテーテルである、請求項13に記載の方法。

15. 前記抗微小管剤が、管腔内デバイスを通じて投与される、請求項10に記載の方法。

16. 移植片拒絶を処置するための方法であって、患者に抗微小管剤を投与する工程を包含する、方法。

17. 前記抗微小管剤が、パクリタキセル、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

18. 外科的接着を処置または予防するための方法であって、該外科的癒着は処置または予防されるように、患者に治療有効量の抗微小管剤を投与する工程を包含し、ただし、該外科的癒着は、パクリタキセル、またはそのアナログもしくは

誘導体ではない、方法。

19. 前記抗微生物管剤が、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス- (スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

20. 炎症性腸疾患を処置するための方法であって、炎症性腸疾患が処置または予防されるように、患者に有効量の抗微生物管剤を投与する工程を包含する、方法。

21. 前記微生物管剤が、パクリタキセル、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス- (スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

22. 慢性炎症性肺疾患を処置または予防するための方法であって、鼻ポリープが、処置または予防されるように、患者に治療有効量の抗微生物管剤を投与する工程を包含する、方法。

23. 前記抗微生物管剤が、パクリタキセル、エポチロンAまたはB、ジスコデルモリド、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール、ツベルシジン、LY290181、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス- (スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、およびそれらのアナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

24. 前記抗微生物管剤が、鼻に投与される、請求項22に記載の方法。

25. 前記薬剤が、さらにポリマーを含む、請求項1、4、6、8、14、または16のいずれか1項に記載の方法。

26. 前記ポリマーが、0.5と200  $\mu m$  との間の平均サイズを有するミクロスフェアに形成されている、請求項25に記載の方法。

27. 前記ポリマーが、乳酸およびグリコール酸のコポリマーである、請求項2



5に記載の方法。

28. 前記ポリマーが、ポリ（カプロラクトン）を含む、請求項25に記載の方法。

29. 前記ポリマーが、ポリ（乳酸）を含む、請求項25に記載の方法。

30. 前記ポリマーが、ポリ（乳酸）およびポリ（カプロラクトン）のコポリマーである、請求項25に記載の方法。

31. 前記ポリマーが、エチレンビニル酢酸を含む、請求項25に記載の方法。

32. 前記ポリマーが、イソプロピルミリスレートを含む、請求項25に記載の方法。

33. 前記ポリマーが、Transcutol<sup>®</sup>を含む、請求項25に記載の方法。

34. 前記ポリマーが、ジブロッタコポリマーまたはトリブロックコポリマーである、請求項25に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

炎症性疾患を処置または予防するための組成物および方法

**技術分野**

本発明は、一般に、炎症性疾患を処置または予防するための組成物および方法に関する。

**発明の背景**

炎症性疾患（慢性または急性性質のいずれも）は、健康管理産業において重要な問題を提示する。簡潔には、慢性炎症は、延長した持続時間（週または月）の炎症であり、ここでは、急性炎症、組織破壊、および治癒の試みが同時に進行していると考えられる（R. S. Cotran, V. Kumar、およびS. L. Robbins, W. B. Saunders Co.による、Robbins Pathological Basis of Disease、75頁、1989）。慢性炎症は、急性炎症発症に続いて起こり得るが、遅延した過敏症反応、内因性毒素（例えば、上昇した血漿脂質）または外因性毒素（例えば、シリカ、アスベスト、シガレットタール、外科的接着）への延長した曝露、または身体自体の組織に対する自己免疫反応（例えば、リウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬）を起こす持続性感染（例えば、結核、梅毒、真菌感染）の結果として、時間とともに進行する、潜伏性プロセスとしても始まり得る。慢性炎症性疾患は、従って、多くの共通の医療症状（例えば、リウマチ様関節炎、再狭窄、乾癬、多発性硬化症、外科的接着、結核、および慢性炎症性肺疾患（例えば、喘息、塵肺症、慢性閉塞肺疾患、鼻ポリープ、および肺線維症））を含む。

**乾癬**

乾癬は、共通の、慢性炎症性皮膚疾患であり、容易に、痒み、火傷、刺痛、および出血を起こす、惹起された病変、炎症性病変、肥厚した病変、および鱗状の病変によって特徴付けられる。約10%の患者において、乾癬は、明白なリウマチ様関節炎に見られる変化と類似の関節症状をとまなう。米国人口の約2～3%が、

乾癬に罹患しており、250,000の新しい事症が毎年診断されている。

乾癬が多遺伝子性の自己免疫障害であるという重要な証拠が存在するが、現在、乾癬の原因は知られていない。さらに、乾癬に対する治療は、現在のところ存在しない。利用可能な処置には、局所治療（例えば、ステロイドクリームおよびステロイド軟膏、コールタールおよびアントラリン（anthralin））、および全身処置（例えば、ステロイド、ウルトラバイオレットB、PUVA、メトトレキサート、およびシクロスポリン）が含まれる。しかし、不満足な緩解速度および／または潜在的な重篤な副作用は、ほとんどの抗乾癬治療を特徴づけている。米国における乾癬処置の全体の費用は、一年あたり、30億ドル～50億ドルの間であると見積られており、これは、乾癬を主要な保健管理問題にしている。

#### 多発性硬化症

多発性硬化症(MS)（米国において350,000人（女性：男性＝2：1）が罹患しており、8,000の新しい事症が毎年報告されている）は、神経系に關与する、最も一般的な慢性炎症性疾患である。代表的には、MSは、臨床的に、数年間の期間にわたって存在する有害な神経学的欠損の反復性発症として存在する。およそMSの半分の事症が、より慢性相（phase）に進行する。この疾患は早期には死亡または認識機能障害を生じないが、視覚的知覚を妨害すること；複視の刺激；歩行および手の使用に影響を及ぼす運動機能を妨害すること；腸失調、および膀胱失調を生じること；痙縮；ならびに感覚（触覚、痛み、および温度感受性）不損によって、患者を不自由にする。

MSは自己免疫疾患であるという重要な証拠があるが、MSの原因は知られていない。現在、多発性硬化症に利用可能な治療は存在せず、そして現在の治療法は、部分的に成功しているにすぎない。例えば、メトトレキサート、シクロスポリン、およびアザチオプリンのような化学療法剤が、処置に応答しない進行性疾患を有する患者の取り扱いのために試験されているが、最小限の長期的の有利な効果が、今日までに実証されているにすぎない。近年認可されている他の治療剤には、再発性回復（relapsing-remitting）MSに罹患した外来患者の使用のためのインターフェロン- $\beta$ が含まれる（Patyら、Neurology 43:662-667, 1993）（特に、Bet

aseron (組換えインターフェロン $\beta$ -1 $\beta$ ; 17位が置換されたヒトインターフェロン、Cys@Ser $\beta$ ; Berlex/Chiron) またはAvonex (組換えインターフェロン $\beta$ -1 $\alpha$ ; 哺乳動物細胞で産生されたグリコシル化ヒトインターフェロン $\beta$ ; Biogen) )。不運なことに、BetaseronはMS患者に増大した生活の質を提供するが、疾患進行は顕著に改善されるようではない。Betaseron治療をとまなう有害な経験には、以下が挙げられる: 注射部位反応 (炎症、痛み、過敏症、および壊死)、ならびにインフルエンザ様症状合併症 (発熱、悪寒、不安、および錯乱)。

### リウマチ様関節炎

リウマチ様関節炎 (RA) は、世界人口の1%~2%に発症している衰弱性慢性炎症性疾患である。この症状は、身体の数多くの関節の痛み、膨張、および破壊を起こし、そしてまた肺および腎臓などの他の器官に損傷を生じ得る。進行した疾患を有する人々は、ガンのいくつかの形態よりも大きな死亡率を有し、そしてこのために、処置法は、不可逆的な関節障害の可能性を減少するように設計された、積極的な初期薬物治療にふかってシフトしている。American College of Rheumatologyの最近の推奨 (Arthritis and Rheumatism 39(5):713-722, 1996) には、確立された診断および発症している症状を有する任意の患者に対する疾患を改変する抗リウマチ薬物 (DMARD) 治療の早い開始が含まれる。抗ガン薬は、莫大な数の患者に対して、リウマチ学者の60%~70%により選択される薬物である、化学療法薬 (メトトレキサート) での第一線の治療となった。疾患の重篤度は、しばしば、この薬物での無期限の毎週の処置を確実にし、そして疾患がメトトレキサート治療にも関わらず進行する患者 (患者の50%以上) では、第二線の化学療法薬 (例えば、シクロスポリンおよびアザチオプリン (単独または組合せて)) が頻繁に使用されている。

### 再狭窄

再狭窄は、血管壁肥厚化、および組織へ血管によって供給される血流の減少を導く、慢性血管創傷の形態である。これは、これは、血管閉塞を解放することを試みる実質的に任意の操作を含む血管再構築手順に応答して起こり、そして血管

疾患の侵襲性処置の効果を制限する主要因子である。再狭窄は、過去15年間の心

臓血管研究の主要な試みである。1994年の評価 (U. S. Heart and Stroke Foundation) によると、6千万人を越えるアメリカ人が1つ以上の心血管疾患の形態を有する。これらの疾患は、同じ年に約100万人 (米国における全死亡の41%) の生命を奪い、そして先進国で、死および身体障害の主要な原因であると考えられる。

現在、技術的に承認された、ヒトに有効であった、再狭窄の予防のための処置は存在しない。研究されている全身的治療剤には、内皮欠失の処置に指向される薬剤である、(抗血小板剤 (例えば、アスピリン)、血管拡張薬 (例えば、カルシウムチャンネルブロッカー)、抗トロンビン剤 (例えば、ヘパリン)、抗炎症剤 (例えば、ステロイド)、血管平滑筋細胞 (VSMC) 増殖防止剤 (例えば、コルチシン)、および再内皮化 (reendothelialization) の促進剤 (例えば、血管内皮増殖因子)) が含まれる。研究されている局所処置には、局所的薬物送達 (例えば、ヘパリン)、ならびに  $\beta$  線照射および  $\gamma$  線照射が含まれる。全てがヒトの使用において期待はずれであった。なぜなら、第一に、それらは再狭窄プロセスの限定された部分で作用するようであるからである。全身処置はまた、好ましくない全身的合併症および毒性を引き起こすことなく、持続する生物学的効果を提供するために、疾患の部位における薬物の適切な吸収および保持を達成するという、さらなる問題に遭遇する。

#### 炎症性腸疾患

炎症性腸疾患 (IBD) は、小腸および大腸での炎症または潰瘍を引き起こす慢性障害 (本来性クローン病および潰瘍性大腸炎) をいう。簡潔には、米国では約200万人 (罹患している男性と女性の数は等しい) がIBDに罹患している。発生数のピークは、15歳と30歳の年齢の間で起こり、そして第二のピークはしばしば55歳と60歳の年齢の間で報告される。多くの実証された有病割合パターンが存在するが、これは未知の原因の疾患である。

IBDは、しばしば、交互の緩解期間、それに続く重篤度の変化する予測不可能な再発または発赤の期間によって特徴付けられる。約50%の患者が任意の所定の

時間で緩解し、そして多数が、10年間の期間で、少なくとも1つの再発を起こす

。さらに、最も一般的には関節炎であるこの疾患に付随する、多くの全身的合併症が存在する。関節炎の症状は、IBDを有する全ての人々の1/4に起こる。関節炎は、結腸が、疾患プロセスに関与した場合に最もしばしば起こり、そして腸疾患が最も活性である場合は発赤が拡大する。この炎症性関節炎の形態は、永久的な変形を起こさず、そしてしばしば、短命である。この疾患の他の合併症には、眼の炎症（虹彩炎、結膜炎、および上強膜炎）、口の炎症（粘膜炎）、皮膚炎（結節性紅斑および壊疽性膿皮症）、筋骨格異常（強直性脊椎炎）、腎合併症（腎結石、および尿管への瘻孔形成）、胆石、ならびに他の肝臓疾患（例えば、肝炎）および胆汁系の疾患（硬化性胆管炎）が含まれる。不運なことに、多くの場合、長期（>10年）の疾患はより重篤な合併症（例えば、結腸ガンおよび腸以外のガン）を導き得る。

現在では、IBDに対する治療は存在しない。現在の治療剤の多くは、この疾患に関連した炎症を抑制することによってこの疾患症状を制御することに焦点をあてている。IBDの処置に使用される主たる薬物には、アミノサリチレートおよびコルチコステロイドであり、これらの薬剤に良好に応答しない個体については、抗生物質および免疫抑制医薬品もまた使用され得る。薬物処置が70から80%の患者に有効であるが、より活性な疾患を有する個体には手術がしばしば必要とされる。小腸の妨害物、穿孔、膿瘍、および出血のような活性な疾患に関連した慢性症状および合併症は軽減され、そして侵襲的手術で矯正され得る。手術は永久的に疾患を治療せず、再発率が高いが、活性症状を軽減する。

#### 外科的接着

外科的接着形成、通常別々である身体組織がともに増殖する複雑なプロセスは、手術外傷の結果として最も共通に見られる。これらの手術後接着は、主要な婦人科手術を経験した患者の60～90%に起こり、そして先進国において腸閉塞の最も一般的な原因の1つである。これらの接着は、失敗した手術治療の主要原因であり、そして腸閉塞および不妊症の主な原因である。他の接着処置合併症には、慢性骨盤痛、尿道閉塞、および排尿機能不全が含まれる。現在では、手術の4～

5日後に投与される予防的治療が、接着形成を阻害するために使用される。接着予防の種々の様式が研究されており、これには、(1) フィブリン沈着の呼ぶ、(2) 局所的組織炎症の低減、および(3) フィブリン沈着の除去が含まれる。フィブリン沈着は、機会的または粘稠性溶液から構成される物理学的バリアの使用により予防される。多くの研究者が接着予防バリアを利用しているが、多くの技術的困難が存在する。炎症は、コルチコステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤のような薬物の投与によって低減される。しかし、動物モデルにおけるこれらの薬物の使用による結果は、炎症応答の程度および全身的副作用による用量制限により勇気づけられるものではない。最後に、フィブリン沈着の除去は、タンパク質分解酵素および線維素溶解酵素を使用して研究されている。これらの酵素の臨床使用に可能性のある合併症は、過度の出血の可能性である。

#### 炎症性肺疾患

慢性炎症性肺疾患には、例えば、喘息、塵肺症、慢性閉塞肺疾患、鼻ポリープ、および肺線維症が含まれる。代表的には、このような疾患は、侵襲性炎症プロセスおよび影響を受けた組織の肥厚によって特徴付けられる。

例えば、鼻ポリープは、鼻の内層の組織の肥厚によって特徴付けられる。ポリープは、喘息、嚢胞性繊維症、原発性線毛運動不全、および免疫不全のような呼吸性疾患に起こり得る。鼻ポリープは、上気道を含む慢性炎症性プロセスの症状として発達すると考えられる。これらは、アスピリン不耐性の患者の36%、喘息を有する患者の7%、子供の0.1%、そして嚢胞性繊維症の患者の約20%に見られる。鼻ポリープに関連した他の症状は、チャージ-ストラウス症候群、アレルギー性真菌副鼻腔炎、および線毛運動不全症候群、およびヤングの症候群である。外科的ポリープ切除を行った患者の約40%が再発する (Settipane, Allergy Asthma Proc. 17(5):231-236, 1996)。

鼻ポリープ症の主な症状は、鼻の閉塞およびにおいの感度の妨害である。鼻ポリープ症の医学的処置の目的は、(1) 鼻ポリープおよび鼻炎症状を除去すること、(2) 鼻呼吸および嗅覚を再確立すること、および(3) 再発を予防することである。少数の大きなポリープによる鼻の経路の閉塞は、簡単なポリープ切除に

よって処置され、患者の、鼻を通しての呼吸を援助し得る。手術の目的は、可能な限りポリープのない気道をつくり、そして感染した副鼻腔炎の排液を可能にすることによる鼻の生理学的特性を復旧することである。しかし、鼻ポリープの再発は、臨床的鼻科学の最も共通した未解決問題の1つである。ポリープの補足的医学的処置は、常に必要であり、手術では粘膜疾患の炎症性成分を処置出来ない。局所的なコルチコステロイドは、ポリープのサイズを減少するため、および手術後の再発を予防するために、最も広範に利用される処置である。ステロイドは、鼻炎を減少し、鼻呼吸を改善し、ポリープのサイズを減少し、そして再発率を減少させ、においの感受性および任意の腔病理学に対して無視できる効果を有する。しかし、プロープにおけるステロイドの使用は、抗生物質を必要とする感染性合併症をとともなう。鼻ポリープの処置のための他の薬物には、H1-レセプターアンタゴニスト（例えば、アゼラスチンHCL）および抗利尿薬（例えば、フロセミド）が含まれる。これらの処置は、常に効果的であるというわけではなく、そして再発率は依然として非常に高い。鼻ポリープの現在の医学的処置は、コルチコステロイドを利用し、疾患の症状を緩和するが、この疾患の原因となる病理学に対する作用はない。さらに、この疾患の再発、またはステロイド治療に対する耐性が、鼻ポリープを有する患者に見られる。

#### 移植片拒絶

移植片拒絶は複雑なプロセスであり、それにより、移植片組織は宿主免疫系によって外来物として認識される。形態学および基礎となる機構を元に、拒絶反応は3つのカテゴリー：超急性、急性、および慢性に分類される。乾癬の危険性が除去され、そして免疫抑制治療によって初期（急性）拒絶が管理されるとともに、慢性拒絶が、移植片機能不全および最終的な失敗の増加する重要な原因になった。現在、慢性的な血管拒絶は、最初の年後の心臓移植レシピエントに、おける死または移植の失敗の主要な原因である。

本発明は、炎症性疾患を処置または予防するために適した組成物および方法を提供する。これらの組成物および方法は、現存する手順を伴う問題を取り扱い、現存する手順と比較して有意な利点を提供し、そして他の関連した利点をさらに



提供する。

#### 発明の要旨

簡潔に述べると、本発明は、炎症部位に抗微小管剤を送達する工程を包含する、炎症性疾患を処置または予防するための方法を提供する。このような薬剤の化学剤は、タキサン類（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル（docetaxel））、カンボテシン、エレウテロビン（eleutherobin）、サルコジクチン類（sarcodistyin）、エポチロン（epothilone）AおよびB、ジスコデルモリド（discodermolide）、重水（D<sub>2</sub>O）、ヘキシレングリコール（2-メチル-2,4-ペンタンジオール）、ツベルシジン（7-デアザアデノシン）、LY290181（2-アミノ-4-(3-ピリジル-4H-ナフト（1,2-b）ピラン-3-カルドニトリル）、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-（スタシンイミジルスクシネート）、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質、TALP）、高浸透性（190ミリオスモル/L）状態によって誘導される細胞膨張、インスリン（100nmol/L）またはグルタミン（10mmol/L）、ダイニン結合、ジベレリン（gibberelin）、XCH01（キネシン様タンパク質）、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁成分（例えば、ポリ-L-リジンおよびエキソテンシン）、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管結関連タンパク質（例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン、延長因子-1- $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、およびE-MAP-115）、細胞体（例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質、および動原体）、内因性微小管構造物（例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ）、安定な細管のみのポリペプチド（stable tubule only polypeptide）（例えば、STOP145およびSTOP220）、および有糸分裂応力からの張力、ならびに上記のいずれかのアナログおよび誘導体が含まれる。他の実施態様においては、抗微小管剤は、ポリマーをさらに含むように処方される。

処置され得る炎症性疾患の代表的な例には、多発性硬化症、乾癬、関節炎、狭窄、移植片拒絶、外科的接着、炎症性腸疾患、および炎症性肺疾患が含まれる。

本発明の特定の実施態様において、抗微小管剤は、例えば、軟膏、クリーム、

ローション、ゲル、スプレーなどのような他の成分または組成物とともに処方され得る。特定の実施態様において、化合物または組成物は、ポリマーまたは非ポリマーのいずれかであり得るキャリアとして機能し得る。ポリマーキャリアの代表的な例には、ポリ（エチレン-ビニルアセテート）、乳酸とグリコール酸とのコポリマー、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸）とポリ（カプロラクトン）とのコポリマー、ゼラチン、ヒアルロン酸、コラーゲンマトリックス、およびアルブミンが含まれる。他の適切なキャリアの代表的な例には、エタノール；エタノールおよびグリコールの混合物（例えば、エチレングリコールまたはプロピレングリコール）；エタノールおよびイソプロピルミリステートの混合物、またはエタノール、イソプロピルミリステート、および水（例えば、55:5:40）の混合物；エタノールおよびエイネオールまたはD-リモネンの混合物（水有りまたは無し）；グリコール（例えば、エチレングリコールまたはプロピレングリコール）ならびにプロピレングリコールおよび水、ホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、Transcutol®のようなグリコール、またはテルピノレンの混合物；イソプロピルミリステートおよび1-ヘキシル-2-ピロリドン、N-ドデシル-2-ピペリジノン、または1-ヘキシル-2-ピロリドンの混合物が含まれる。

さらに他の局面において、抗微小管剤は、例えば、ステント、縫合、留置カテーテル、人工器官などのような外科用または医療用デバイスもしくは移植物によって放出するために、これらの内部に含まれるか、またはこれらに適合されて処方され得る。

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面と参照すれば明らかとなる。さらに、より詳細な特定の手順、デバイス、または組成物を記載した種々の参考文献が以下に示され、従って、それらの全体が参考として援用される。

#### 図面の簡単な説明

図1Aは、好中球（ $5 \times 10^6$  細胞/ml）の血漿オプソニン化CPPD結晶（50mg/ml）に対する化学発光応答を示すグラフである。（○）パクリタキセルなし、（●）4.

5  $\mu$ M、( $\Delta$ ) 14  $\mu$ M、( $\blacktriangle$ ) 28  $\mu$ M、( $\square$ ) 46  $\mu$ M; n=3におけるパクリタキセル (「タキソール」ともいう) の効果。図1Bは、血漿オプソニン化CPPD結晶誘導好中球化学発光のパクリタキセル阻害の経時的濃度依存性を示すグラフである。図1Cは、化学発光によって測定された場合の、オプソニン化ザイモザン (zymozan) 誘導好中球活性化におけるフッ化アルミニウムの効果を示すグラフである。図1Dは、化学発光によって測定された場合の、オプソニン化ザイモザン誘導好中球活性化におけるグリシンエチルエステルの効果を示すグラフである。図1Eは、オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光におけるLY290181の効果を示すグラフである。

図2は、血漿オプソニン化CPPD結晶 (50mg/ml) の応答における好中球 ( $5 \times 10^6$  ml) からのリゾチーム放出を示すグラフである。(○) パクリタキセルなし、(●) 28  $\mu$ M、( $\Delta$ ) コントロール (細胞単独)、( $\blacktriangle$ ) コントロール (細胞および28  $\mu$ Mのパクリタキセル) ; n=3におけるパクリタキセルの効果。

図3Aは、血漿オプソニン化CPPD結晶 (50mg/ml) への応答における好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) によるスーパーオキシドアニオン産生を示すグラフである。(○) パクリタキセルなし、(●) 28  $\mu$ M、( $\Delta$ ) コントロール (細胞単独) ; n=3でのパクリタキセルの効果。図3Bは、血漿オプソニン化CPPD結晶誘導好中球スーパーオキシドアニオン産生のパクリタキセル阻害の経時的濃度依存性を示すグラフである。図3Cは、CPPD結晶誘導好中球スーパーオキシドアニオン産生におけるLY 290181の効果を示すグラフである。

図4Aは、血漿オプソニン化サイモサン (1mg/ml) に対して応答する好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) の化学発光応答を示すグラフである。(○) パクリタキセルなし、(●) 28  $\mu$ M; n=3でのパクリタキセルの効果。図4Bは、血漿オプソニン化サイモサン誘導好中球スーパーオキシドアニオン産生を示すグラフである。(○) パクリタキセルなし、(●) 28  $\mu$ M、( $\Delta$ ) コントロール (細胞単独) ; n=3でのパクリタキセルの効果。

図5Aは、血漿オプソニン化CPPD結晶 (50mg/ml) への応答における好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) からのミエロペルオキシダーゼ放出を示すグラフである。(○) パクリタキセルなし、(●) 28  $\mu$ M、( $\Delta$ ) コントロール (細胞単独)、( $\blacktriangle$ ) コ

ントロール（細胞および $28\mu\text{M}$ のパクリタキセル）； $n=3$ でのパクリタキセルの効果。図5Bは、血漿オプソニン化CPPD結晶への応答における好中球からのミエロペルオキシダーゼ放出のパクリタキセル阻害の濃度依存性を示すグラフである； $n=3$ 。図5Cおよび5Dは、LY290181が、CPPD結晶誘導好中球におけるリゾチームおよびミエロペルオキシダーゼの両方を減少させることを示すグラフである。

図6は、種々の濃度のパクリタキセルでの星状細胞の増殖を示すグラフである。

図7は、インビトロでのケラチノサイトにおけるパクリタキセルの効果を示すグラフである。

図8Aおよび8Bは、星状細胞形態学におけるパクリタキセルの効果を示すグラフである。電子顕微鏡画像は、トランスジェニックコントロール動物の星状細胞における、厚く、良好に組織化された線維様の突起を明らかにしたが、一方で、パクリタキセルで処置したトランスジェニック動物は、形態学的に変化した星状細胞を有した。パクリタキセルは、非処置の動物と比較して、星状細胞の円形化、細い細胞の突起、および減少した細胞質線維を誘導した。

図9は、 $10^{-8}\text{M}$ より大きい濃度のパクリタキセルで処置したEOMA細胞の生存率を示すグラフである。

図10は、増大した濃度のパクリタキセルで処置した培養物におけるアポトーシスEOMA細胞の割合を示す棒グラフである。図11A～11Eは、24時間後の滑膜細胞における種々の抗微小管剤の効果を示すグラフである。

図12A～12Hは、コラゲナーゼ発現を阻害する種々の抗微小管剤の効果を示すプロットである。

図13A～13Hは、プロテオグリカン発現における種々の抗微小管剤の効果を示すプロットである。

図14Aおよび14Bは、コントロール（充填されていない）サーモペースト（thermopaste）で処置した腫瘍を有するCAMの2つの写真である。簡潔には、図14Aにおいて、中央の白い塊は腫瘍組織である。全ての方向においてCAMから腫瘍へ多数の血管が侵入していることに留意すること。腫瘍は、「血管形成因子」の産生によって宿主血管の増殖を誘導する。腫瘍組織は血管形成因子を提供する血管に

沿って遠位方向に広がる。図14Bは、15Aに示されるCAMの底側の観察である。簡

潔には、この観察は車輪のスポークのように腫瘍に侵入する血管の放射状形態を示す。血管密度は、周囲の正常CAM組織においてよりも、腫瘍の近傍で大きいことに留意すること。図14Cおよび14Dは、20%のパクリタキセルを充填したサーモペーストで処置した腫瘍を有するCAMの2つの写真である。簡潔には、図14Cにおいて、中央の白い塊は、腫瘍組織である。腫瘍組織の近傍における少数の血管に留意すること。抗微小管剤の持続性放出が、腫瘍によって産生される血管形成刺激を克服し得る。腫瘍自体は、血管新生化に乏しく、そして漸次サイズを減少する。図14Dは、14Cに示されるCAMの底側から撮影され、そしてコントロール腫瘍組織と比較した場合、腫瘍中への血流の妨害を示す。血管密度は腫瘍の近傍において減少し、そして正常の周辺CAM組織の腫瘍よりも空間があることに留意すること。

図15Aは、6日目の殻のない卵を示す写真である。図15Bは、生きた、非染色毛細血管の実体顕微鏡で撮影したデジタル化コンピュータディスプレイ画像（1040×）である。図15Cは、より大きな下にある血管によって給餌される絨毛尿膜（chorioallantoic membrane）（CAM）微小血管を示す腐食キャストの写真（矢印；1300×）である。図15Dは、CAMを通して横方向に切断し、そして光学顕微鏡レベルで記録した、0.5mm厚の可塑性セクションを示す写真である。この写真は、外側二重層外胚葉（Ec）、毛細血管（矢印）および散乱した外膜細胞を含む中胚葉（M）、ならびに一重層内胚葉（En）を含む、CAMの組成（400×）を示す。図15Eは、電子顕微鏡レベル（3500×）での写真であり、ここで、代表的な毛細管構造は薄い壁の内皮細胞（矢印の頭）および結合した周皮細胞を表して示される。

図16A、16B、16C、および16Dは、10mlのメチルセルロース当たりの10 $\mu$ gパクリタキセルに48時間曝した後に撮影した4つの異なった非染色CAMのデジタル化画像である。パクリタキセルを含む透明なメチルセルロースディスク（\*）は、各CAMの上に存在し、そして周辺血液島（Is）とともに1つの無血管性ゾーン（A）上に配置される。これらの無血管性領域は、ディスクを越えて伸長し、そして

代表的には約6mmの直径を有する。図16Dは、無血管性ゾーンの周縁から小血管および大血管の両方の代表的な「押し分け (elbowing)」効果 (矢印の頭)

を示す。

図17Aは、有糸分裂に止まった多数の内皮細胞を示す無血管性ゾーンに接した周辺の毛細血管 (矢印の頭) を示す写真 (=400×) である。外胚葉 (Ec) ; 中胚葉 (M) ; 内胚葉 (En)。図17B (=400×) は、無血管性ゾーン内で、固有の代表的な毛細管構造から除去され、そして多数の血管外遊出した血液細胞 (矢印の頭) が存在することを示す。図17C (=400×) は、無血管性ゾーンの中央領域において、赤血球細胞が中胚葉中に分散されることを示す。

図18Aは (=2,200×) は、有糸分裂 (\*) が止まった3つの内皮細胞を保有する外胚葉層 (Ec) のすぐ下に横たわる小毛細管を示す。外胚葉および中胚葉の両方におけるいくつかの他の細胞型もまた有糸分裂が止まっている。図18B (=2,800×) は、外胚葉の基礎的な血管外遊出した血液細胞を含む初期の無血管性相を示す; これらの血液細胞は、推定の上皮細胞 (\*) とそれらの突起と混ざり合う。衰退した細胞の液胞 (矢印の頭)。図18C (=2,800×) は、パクリタキセルに対する応答において、表面-中胚葉海綿は、密な液胞および顆粒を含む衰退の種々の段階にある細胞が集まるようになる (矢印の頭)。

図19Aは、マトリックス金属プロテアーゼの転写調節を図式的に示す。図19Bは、IL-1は、AP-1転写活性を刺激することを示すプロットである。図19Cは、IL-1が、パクリタキセルで前処理された軟骨細胞からの溶解物における減少した結合活性を誘導することを示すグラフである。

図20は、IL-1誘導が、軟骨細胞におけるRNAレベルにおけるコラゲナーゼおよびストロメライシンを増加させること、およびこの誘導は、パクリタキセルの前処理によって阻害され得ることを示すプロットである。

図21は、インビトロでの正常な軟骨細胞の生存率に対するパクリタキセルの効果を示す棒グラフである。

図22は、パクリタキセルの観察された偽一次分解速度をプロットするグラフである (37℃で、それぞれ3.7および4.9のpHでの、10%HP  $\beta$  f3CDおよび10%HP  $\gamma$  CD

溶液中の $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  )。

図23は、37℃でのシクロデキストリンおよびパクリタキセルについての相溶解性を示すグラフである。

図24は、37℃での、パクリタキセルおよび $\gamma$  CD、HP  $\beta$  CD、またはHP  $\gamma$  CDの複合化の二次プロットである。

図25は、PDLLA-PEG-PDLLA組成物の融解湿度、エンタルピー、分子量、多分散性、および固有の粘度を示す表である。

図26は、PDLLA-PEG-PDLLAおよびPEGのDSCサーモグラフを示すグラフである。加熱速度は、10℃/分であった。融解温度およびエンタルピーについては、図30を参照のこと。

図27は、37℃で、20%パクリタキセルを充填したPDLLA-PEG-PDLLAシリンダーからPBSアルブミン緩衝液へのパクリタキセルの累積的な放出を示すグラフである。エラーバーは、4 サンプルの標準偏差を示す。40%PEGのシリンダーを、崩壊のために4日で中断した。

図28A、28B、および28Cは、37℃でのパクリタキセルのインビトロ放出の間の20%パクリタキセルを充填したPDLLA-PEG-PDLLAシリンダーの大きさである、長さ(A)、直径(B)、および湿重量(C)における変化を示すグラフである。

図29は、37℃でのPBSアルブミン緩衝液中への放出の間のPDLLA-PBG-PDLLAシリンダー(20%パクリタキセルを充填した)の質量損失およびポリマー組成変化を示す表である。

図30は、37℃でのPBSアルブミン緩衝液中における放出の間の、20%パクリタキセルを充填したPDLLA-PEG-PDLLAシリンダー(20%PEG、1 mm直径)のゲル透過性クロマトグラムを示すグラフである。

図31A、31B、31C、および31Dは、パクリタキセル放出の前および放出の間の乾燥したPDLLA-PEG-PDLLAシリンダーのSEMである。A: 20%PEG、0日; B: 30%PEG、0日; C: 20%PEG、69日; D: 30%PEG、69日。

図32は、37℃での、20%パクリタキセルを充填したPDLLA:PCLブレンドおよびPCLからPBSアルブミン緩衝液へのパクリタキセルの累積放出を示すグラフである。

。エラーバーは、4 サンプルの標準偏差を示す。

図33は、37℃で、PCLペーストからPBSへのパクリタキセルの放出を、経時的に示すグラフである。PCLペーストは、メッシュ#140を使用して調製されたパクリタキセルの微粒子および種々の添加物を含む。エラーバーは、3 サンプルの標準偏差を示す。

図34は、37℃でのPBSへのパクリタキセル-ゼラチン-PCLペーストからのパクリタキセル放出の時間経過を示すグラフである。このグラフは、ゼラチン濃度（メッシュ#140）、およびメッシュ#140またはメッシュ#60を使用して調製したパクリタキセル-ゼラチン（1：1）微粒子のサイズ効果を示す。エラーバーは、3 サンプルの標準偏差を示す。

図35Aおよび35Bは、37℃における蒸留水中の懸濁に続く、20%パクリタキセルを含むPCLペーストの膨潤挙動における、添加物（17A；メッシュ#140）および微粒子のサイズ（17B；メッシュ#140または#60）および添加物（メッシュ#140）の割合の効果を示すグラフである。マトリックスの崩壊のために、パクリタキセル-ゼラチン中に270  $\mu\text{m}$ 微粒子で調製したペーストおよび30%ゼラチンを含むペーストに対する測定を、4 時間後に中断した。エラーバーは、3 サンプルの標準偏差を示す。

図36A、36B、36C、および36Dは、37℃で6 時間、蒸留水中に懸濁する前（36A）および後（36B）のパクリタキセル-ゼラチン-PCL（20:20:60）ペーストの代表的な走査電子顕微鏡写真である。写真36Cおよび36Dは、36Bより高い倍率であり、パクリタキセル（ロッド型）およびゼラチンマトリックスの緊密な結合を示す。

図37Aおよび37Bは、パクリタキセル処理CAMにおいて無血管のゾーンを示す、ゼラチン-PCL（37A）およびパクリタキセル-ゼラチン-PCL（20:20:60；37B）ペーストで処理されたCAMの代表的な顕微鏡写真である。

図38は、37℃での水中でのシクロデキストリンおよびパクリタキセルの相溶解性を示すグラフである。

図39は、37℃でのパクリタキセルおよび $\gamma$  CD、HP  $\beta$  CD、またはHP  $\gamma$  CDの複合化



の二次プロットを示すグラフである。

図40は、37℃でのパクリタキセル、および50：50水：エタノール溶液中のヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンの相溶解性を示すグラフである。

図41は、37℃での0、5、10、または20%HP γ CD溶液中のパクリタキセルの溶解速度プロファイルを示すグラフである。

図42は、37℃、およびそれぞれ3.7および4.9のpHでの、10%HP β CDおよび10%HP γ CD溶液中のパクリタキセル (20 μg/ml) の、観察された偽一次分解速度をプロットしたグラフである。

図43Aおよび43Bは、それぞれ、EVAフィルムからのパクリタキセルの放出、および経時的に同フィルムに残存するパクリタキセルの割合を示す2つのグラフである。図43Cは、経時的なパクリタキセル無しでのEVA/F127フィルムの膨潤を示すグラフである。図43Dは、経時的なパクリタキセル無しでのEVA/Span80フィルムの膨潤を示すグラフである。図43Eは、種々のEVA/F127ブレンドについてのストレス対応力曲線を示すグラフである。

図44は、PCLミクロスフェアに対する0.5mlの細胞 (濃度 $5 \times 10^6$  細胞/ml) 中の好中球 (20mg/ml) ミクロスフェアの化学発光応答における、ポリマー性ミクロスフェアの血漿オプソニン化の効果を示すグラフである。

図45は、PCLミクロスフェアに対する好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) の化学発光応答におけるプレコーティング血漿+/-2%Pluronic F127の効果を示すグラフである。

図46は、PMMAミクロスフェアに対する好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) の化学発光応答におけるプレコーティング血漿+/-2%Pluronic F127の効果を示すグラフである。

図47は、PLAミクロスフェアに対する好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) の化学発光応答におけるプレコーティング血漿+/-2%Pluronic F127の効果を示すグラフである。

図48は、EVA：PLAミクロスフェアに対する好中球 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) の化学発光応答におけるプレコーティング血漿+/-2%Pluronic F127の効果を示すグラフ

である。

図49は、PCLミクロスフェアに対する好中球の化学発光応答における、プレコーティングIgG (2mg/ml) または2%Pluronic F127、次いでIgG (2mg/ml) の効果を示すグラフである。

図50は、PMMAミクロスフェアに対する好中球の化学発光応答における、プレコーティングIgG (2mg/ml) または2%Pluronic F127、次いでIgG (2mg/ml) の効果を示すグラフである。

図51は、PVAミクロスフェアに対する好中球の化学発光応答における、プレコーティングIgG (2mg/ml) 、または2%Pluronic F127、次いでIgG (2mg/ml) の効果を示すグラフである。

図52は、EVA:PLAミクロスフェアに対する好中球の化学発光応答における、プレコーティングIgG (2mg/ml) 、または2%Pluronic F127、次いでIgG (2mg/ml) の効果を示すグラフである。

図53Aは、37℃での、1%、2%、5%、または10%パクリタキセル含有ポリカプロラクトンミクロスフェアからのリン酸緩衝化生理食塩水への放出速度プロファイルを示すグラフである。図53Bは、コントロールミクロスフェアで処理したCAMを示す写真である。図53Cは、5%パクリタキセルを充填したミクロスフェアで処理されたCAMを示す写真である。

図54は、コントロールミクロスフェア (PLLA:GA-85:15) の粒子サイズの範囲を示すグラフである。

図55は、20%パクリタキセルを充填したミクロスフェア (PLLA:GA-85:15) の粒子サイズの範囲を示すグラフである。

図56は、コントロールミクロスフェア (PLLA:GA-85:15) の粒子サイズの範囲を示すグラフである。

図57は、20%パクリタキセルを充填したミクロスフェア (PLLA:GA-85:15) の粒子サイズの範囲を示すグラフである。

図58A、58B、および58Cは、変化するミクロスフェアのサイズの範囲ならびにPLLAおよびGAの種々の比からの、パクリタキセルの放出速度プロファイルを示す

グラフである。

図59Aおよび59Bは、PLLAおよびGAの種々の比での、ミクロスフェアからのパクリタキセルの放出速度プロファイルを示すグラフである。

図60Aおよび60Bは、PLLAおよびGAの種々の比での、ミクロスフェアからのパクリタキセルの放出速度プロファイルを示すグラフである。

図61A、61B、および61Cは、変化するミクロスフェアのサイズならびにPLLAおよびGAの種々の比からの、パクリタキセルの放出速度プロファイルを示すグラフである。

図62は、パクリタキセルナイロンマイクロカプセルからのパクリタキセル放出を示すグラフである。

図63Aおよび63Bは、膀胱組織におけるフィブロネクチンコートPLLAミクロスフェア（63A）、および膀胱組織におけるポリ（L-リジン）ミクロスフェアの写真である。

図64は、ミセルのパクリタキセルが、コラーゲン誘導関節炎ラットモデルにおける毎日の平均関節炎スコアを改善することを示すグラフである。

図65A～65Dは、コラーゲン誘導関節炎ラットモデルにおけるミセル性パクリタキセルの効果を示す一連のX線である。

図66A～66Cは、ラット足首関節の走査電子顕微鏡写真である。

図67は、コラーゲン誘導関節炎ラットモデルにおける組織病理学を示す拡大した観察を示す。

図68Aおよび68Bは、コラーゲン誘導関節炎ラットモデルにおける滑膜血管の拡大した観察を示す。

図69は、マウスの耳におけるオキサゾロンによる接触過敏性反応の誘導を示すグラフである。抗原チャレンジ時、そして次いで、毎日1回の1%のパクリタキセルゲルまたはビヒタルで処置。皮膚炎は、チャレンジ前の耳の厚さと比較した場合、耳の膨張の測定によって定量した。データは平均値 $\pm$ SD (n=5)を示す。  
\*\*p<0.01；\*\*\*p<0.001。

図70は、マウスの耳におけるオキサゾロンによる接触過敏性反応の誘導を示す

グラフである。抗原チャレンジの24時間後に1%のパクリタキセルゲルまたはパクリタキセルビヒクルで最初の処置、そしてその後、毎日1回の処置。皮膚炎は、チャレンジ前の耳の厚さと比較した場合、耳の膨張の測定によって定量した。データは平均値 $\pm$ SD (n=5)を示す。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ 。

図71は、PMAの局所適用によるマウスの耳における皮膚炎の誘導を示すグラフである。PMA適用の1時間後に1%のパクリタキセルゲルまたはビヒクルで最初の処置、そしてその後、毎日1回の処置。皮膚炎は、チャレンジ前の耳の厚さと比較した場合、耳の膨張の測定によって定量した。データは平均値 $\pm$ SD (n=5)を示す。 $*p<0.05$ ； $***p<0.001$ 。

図72は、PMAの局所適用によるマウスの耳における皮膚炎の誘導を示すグラフである。PMA適用の24時間後に1%のパクリタキセルゲルまたはパビヒクルで最初の処置、そしてその後、毎日1回の処置。皮膚炎は、チャレンジ前の耳の厚さと比較した場合、耳の膨張の測定によって定量した。データは平均値 $\pm$ SD (n=5)を示す。 $**p<0.01$ ； $***p<0.001$ 。

図73は、PMAの局所適用によるマウスの耳における皮膚炎の誘導を示す。1%のパクリタキセルゲル（右耳）またはビヒクル（左耳）での前処置。画像は、PMA適用の48時間後に撮影した。パクリタキセル処置右耳と比較した場合、ビヒクル処置左耳の発赤および拡張した血管に留意すること。同様の結果が合計5匹のマウスにおいて観察された。

図74は、DM20トランスジェニックマウスの体重におけるパクリタキセルの効果を示すグラフである。トランスジェニックマウスを毎週3回24日間、ビヒクルまたはパクリタキセル (2.0mg/kg) で処置し、次いで27日目に屠殺した。結果は、パクリタキセルで処置した2匹の動物および1匹の未処置動物についての結果である。パクリタキセル処置動物は、最少の体重減少を示したが、一方、コントロール動物は、29gから22gへ、30%の体重減少を示した。

図75は、トランスジェニックマウスにおける臨床症状の進行における高用量間隔的パクリタキセル治療の効果を示すグラフである。トランスジェニックマウスを1週間に1度、4週間（0週、1週、2週、および3週）20mg/kgのパクリタ

キセルで処置し、そして2週間毎に10週間モニターし、各症状についてスコアを決定した。データは、パクリタキセル処置トランスジェニックマウス (n=5)、およびコントロールマウス (n=3) について、平均スコア (全ての症状について累積) を示す。パクリタキセル処置は、トランスジェニックにおけるDM20の過剰発現によって引き起こされる分解を低減し、その一方、コントロールマウスは、3匹の動物のうちの2匹 (実験プロトコルの最後まで生存しなかった) で非常に早く悪化した (示されるように)。

図76Aおよび76Bは、ラット心臓動脈モデルにおいて血管周囲に (血管の外膜に) 適用されたパクリタキセルペーストを示す。左の総頸動脈の外膜表面を、2.5mgのコントロールペースト (76A)、または20%パクリタキセルを充填した2.5mgのペースト (76B) のいずれかで処置した。コントロール動脈は、平滑筋細胞過

剰増殖により、血管壁の厚さの増大を示したが、その一方、パクリタキセルを充填したペーストは、内膜肥厚の形跡を示さなかった。

図77Aおよび77Bは、ラット心臓血管モデルにおける血管周囲のパクリタキセルペーストの近接効果を示す。血管周囲領域のすぐ側に適用したパクリタキセルを充填したペーストは再狭窄を防いだ；しかし、ペーストが血管壁に直接接しない場合、新内膜過形成は明らかであった。

図78A、78B、および78Cは、星状細胞GFAP染色におけるパクリタキセルの効果を示す。ビヒクルまたはパクリタキセルで処置された正常動物およびトランスジェニック動物 (多発性硬化症に類似した神経疾患を発症した動物) 由来の脳切片をGFAP (活性化星状細胞のマーカー) で染色し、そして組織学的に試験した。コントロールトランスジェニックマウスにおいて、星状細胞の数が増加し、そして総GFAPレベルを正常脳切片と比較した。しかし、細胞の形態は類似であった。パクリタキセルで処置したトランスジェニックマウスの脳切片は、星状細胞の数から減少し、そしてGFAPレベルを非処置トランスジェニック動物と比較した。組織学的には、細胞の円形化および星状細胞における星状突起の薄さである。

図79Aおよび79Bは、パクリタキセルが、ミエリン塩基性タンパク質ペプチド (GP68-88) およびConAに対する応答において、T細胞刺激を阻害することを示す

グラフである。RT-1のT細胞増殖の48時間培養を、刺激剤として、GP68-88

(A) またはConA (B) で行った。パクリタキセルおよびそのビヒクル (ミセル) を、抗原刺激の開始時または24時間後に段階的な濃度で添加した。パクリタキセルは、刺激剤とは関係なく、 $0.02 \mu\text{M}$ ほど低い濃度でT細胞増殖を阻害した。

図80A、80B、80C、および80Dは、ツベルシジンおよびパクリタキセルが、IL-1活性およびTNF誘導NF- $\kappa$ B活性の両方を阻害することを示すグラフである。

図81Aおよび81Bは、クリスタルバイオレット (0.5%) 染色および492nmでの吸光度による定量によって測定した場合、ヒト前立腺ガン細胞 (LNCaP) ( $2 \times 10^3$  細胞/ウェル) の細胞増殖における、パクリタキセルまたはカンプトテシンの増加した濃度の効果を示すグラフである。増殖の割合を、コントロールに対する%および得られた8つの結果の平均として表す。

#### 発明の詳細な説明

本発明を提示する前に、本明細書中以下で使用される特定の提示された用語の定義を理解することは有用であり得る。

本明細書中で使用される「炎症性疾患」は、血管変化：浮腫および好中球の浸潤（例えば、急性炎症反応）；単核細胞による組織浸潤；炎症性細胞、結合組織細胞、およびそれらの細胞産物による組織破壊；ならびに結合組織補充による修復の試み（例えば、慢性炎症反応）によって特徴付けられる任意の多数の疾患をいう。このような疾患の代表的な例には、関節炎、アテローム性動脈硬化症、乾癬、炎症性腸疾患、多発性硬化症、外科的接着、再狭窄、結核、移植片拒絶、および慢性炎症性呼吸疾患（例えば、喘息、塵肺症、慢性閉塞肺疾患、鼻ポリープ、および肺線維症）のような多くの一般的な医療状態が含まれる。

「抗微小管剤」は、任意のタンパク質、ペプチド、化学薬品、または例えば、重合の予防または安定化により微小管の機能を損なう他の分子が含まれることが理解されるべきである。広範な種々の方法が、特定化合物の抗微小管活性（例えば、Smithら (Cancer Lett 79(2):213-219, 1994) およびMooberryら、(Cancer Lett. 96(2):261-266, 1995) によって記載されるアッセイ) を決定するために利用され得る。

上記のように、本発明は、炎症疾患処置または予防するための方法（炎症部位に抗微小管剤を送達する工程を包含する）を提供する。簡潔には、広範な種々の薬剤が、炎症疾患を処置または予防するために、キャリア（例えば、ポリマーまたは軟膏）有りまたは無しのいずれかで、炎症部位（または炎症の潜在的な部位）に送達され得る。このような薬剤の代表的な例には、タキサン類（例えば、パクリタキセル（下記により詳細に記載される）およびドセタキセル）（Schiffら、Nature 277:665-667, 1979; LongおよびFairchild, Cancer Research 54:4355-4361, 1994; RingelおよびHorwitz, J. Natl. Cancer Inst. 83(4):288-291, 1991; Pazdurら、Cancer Treat. Rev. 19(4):351-386, 1993）、カンポテシン、エレンテロビン（例えば、米国特許第5,473,057号）、サルコジクチン類（サルコジクチンAを含む）、エポロチロンAおよびB（Bollagら、Cancer Research 55:2325-2333, 1995）、ジスコデルモリド（ter Haarら、Biochemistry 35:243-250,

1996）、重水(D<sub>2</sub>O)（JamesおよびLefebvre, Genetics 130(2):305-314, 1992; Sollottら、J. Clin. Invest. 95:1869-1876, 1995）、ヘキシレングリコール（2-メチル-2,4-ペンタジオール）（Okaら、Cell Struct. Funct. 16(2):125-134, 1991）、ツベルジジン（7-デアザアデノシン）（Mooberryら、Cancer Lett. 96(2):261-266, 1995）、LY290181（2-アミノ-4-（3-ピリジル）-4H-ナフト（1,2-b）ピラン-3-カルドニトリル）（Pandaら、J. Biol. Chem. 272(12):7681-7687, 1997; Woodら、Mol. Pharmacol. 52(3):437-444, 1997）、フッ化アルミニウム（Songら、J. Cell. Sci. 補遺14:147-150, 1991）、エチレングリコールビス-（スクシンイミジルスクシネート）（CaplowおよびShanks, J. Biol. Chem. 265(15):8935-8941, 1990）、グリシンエチルエステル（Mejillanoら、Biochemistry, 31(13):3478-3483, 1992）、モノクローナル抗イディオタイプ抗体（Leuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(22):10690-10694, 1994）、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質、TALP）（Hwangら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 208(3):1174-180, 1995）、低張によって誘導された細胞膨張（190mosmol/L）状態、インスリン（100nmol/L）、またはグルタミン（10nmol/L）（Haussingerら、Biochem. Cell. Biol. 72(1-2):12-19, 1994）、ジオネイン結合（Ohbaら、Biochim. Biophys. Acta 1158(3)

:323-332, 1993)、ジベレリン(MitaおよびShibaoka, Protoplasma 199(1/2):100-109, 1984)、XCH01 (キネタシン様タンパク質) (Yonetaniら、Mol. Biol. Cell 7(補遺):211A, 1996)、リソホスファチジン酸(Cookら、Mol. Biol. Cell 6(補遺):260A, 1995)、リチウムイオン(BhattacharyyaおよびWolff, Biochem. Biophys. Res. Commun. 73(2):383-390, 1976)、植物細胞壁成分(例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン)(Akashiら、Planta 182(3):363-369, 1990)、グリセロール緩衝液(Schilstraら、Biochem. J. 277(Pt. 3):839-847, 1991;FarrellおよびKeates, Biochem. Cell. Biol. 68(11):1256-1261, 1990;Lopezら、J. Cell. Biochem. 43(3):281-291, 1990)、Triton X-100微小管安定化緩衝液(Brownら、J. Cell Sci. 104(Pt. 2):339-352, 1993;Safiejko-MroczkaおよびBell, J. Histochem. Cytochem. 44(6):641-656, 1996)、微小管関連タンパク質(例えば、MAP2、MAP4、tau、big、tau、エンスコンシン、延長因子-1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )およびE-MAP-115)(Burgessら、Cell Motil.

Cytoskeleton 20(4):289-3000, 1991;Saoudiら、J. Cell. Sci. 108(Pt. 1):357-367, 1995;BulinskiおよびBossler;J. Cell. Sci. 107(Pt. 10):2839-2849, 1994;Okamotoら、J. Cell Biol. 128(5):849-862, 1995;Boyneら、J. Comp. Neurol. 358(2):279-293, 1995;FerreiraおよびCaceres, J. Neurosci. 11(2):392-400, 1991;Thurstonら、Chromosoma 105(1):20-30, 1996;Wangら、Brain Res. Mol., Brain Res. 38(2):200-208, 1996;Moore and Cyr. Mol. Biol. Cell 7(補遺):221-A, 1996;MassonおよびKreis. J. Cell Biol. 123(2), 357-371, 1993)、細胞体(例えばヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体)(Saoudiら、J. Cell. Sci. 108(Pt. 1):357-367, 1995;Simerlyら、J. Cell Biol. 111(4):1491-1504, 1990)、内因性微小管構造(例えば、軸糸構造、プラグおよびGTOキャップ)(Dyeら、Cell Motil. Cytoskeleton 21(3):171-186, 1992;AzharおよびMurphy, Cell Motil. Cytoskeleton 15 15(3):156-161, 1990;Walkerら、J. Cell Biol. 114(1):73-81, 1991;DrechselおよびKirschner, Curr. Biol. 4(12):1053-1061, 1994)、安定な細管のみのポリペプチド例えば、STOP145およびSTOP220)Piroilletら、Biochim. Biophys. Acta 1160(1):113-119, 1992;Pirolletら、Biochem



istry 31(37):8849-8855, 1992;Boscら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(5):2125-2130, 1996;Margolisら、EMBO J. 9(12):4095-4102, 1990)、および有糸分裂応力からの張力(NicklasおよびWard, J. Cell Biol. 126(5):1241-1253, 1994)、ならびに任意の上記の任意のアナログおよび誘導体が含まれる。このような化合物は、脱重合化微小管（例えば、コルチシンおよびビンブラスチン）によって、または安定化微小管形成（例えば、パクリタキセル）のいずれかによって作用し得る。

本発明の1つの好ましい実施態様では、治療剤は、チューブリンへ結合することにより微小管形成を破壊して異常な紡錘体を形成する化合物であるパクリタキセルである。簡単には、パクリタキセルは、高度に誘導体化されたジテルペノイドであり（Waniら、J.Am.Chem.Soc.93:2325, 1971）ジテルペノイドは、*Taxus brevifolia* Pacific Yew. の採集され乾燥された樹皮、ならびにPacific Yew.の*Taxomyces Andreanae*および*Endophytic Fungus*(Stierleら、Science 60:214-216, 1993)から得られている。。「パクリタキセル」プロドラッグ、アナログ、および

び誘導体（（例えば、TAXOL®、TAXOTERE®、ドセタキセル（Docetaxel）、パクリタキセルの10-デスアセチルアナログ、およびパクリタキセルの3'-N-デスベンゾイル-3'-N-t-ブトキシカルボニルアナログ）が含まれることが本明細書中で理解されるべきである）は、当業者に公知の技術（例えば、Sciffら、Nature 277:665-667, 1979;LongおよびFairchild,Cancer Reseach 54:4355-4361,1994;RingelおよびHorwitz,J.Natl.Cancer Inst.83(4):288-291,1991;Pazdurら、Cancer Treat .Rev.19(4):351-386,1993;W094/07882、W094/07881、094/07880、W094/07876、W093/23555、W093/10076、W094/00156、W093/24476、EP590267、W094/20089；米国特許第5,294,637号、同第5,283,253号、同第5,279,949号、同第5,274,137号、同第5,202,448号、同第5,200,534号、同第5,229,529号、同第5,254,580号、同第5,412,092号、同第5,395,850号、同第5,380,751号、同第5,350,866号、同第4,857,653号、同第5,272,171号、同第5,411,984号、同第5,248,796号、同第5,248,796号、同第5,422,364号、同第5,300,638号、同第5,294,637号、同第5,362,831号

、同第5,440,056号、同第4,814,470号、同第5,278,324号、同第5,352,805号、同第5,411,984号、同第5,059,699号、同第4,942,184号；Tetrahedron Letters 35(52):9709-9712, 1994；J.Med.Chem.35:4230-4237,1992；J.Med.Chem.34:992-998,1991；J.Natural Prod.57(10):1404-1410,1994；J.Natural Prod.57(11):1580-1583, 1994；J.Am.Chem.Soc.110:6558-6560, 1988を参照のこと）を利用して容易に調製され得るか、または例えば、Sigma Chemical Co.,St.Louis, Missouri(T7402-Taxus brevifoia由来)を含む、種々の商業的供給源から得られ得る。

このようなパクリタキセル誘導体またはアナログの代表的な例として、7-デオキシドセタキソール、7,8-シクロプロパタキサン、N-置換2-アセチドン、6,7-エポキシパクリタキセル、6,7修飾パクリタキセル、10-デスアセトキシタキソール、10-デアセチルタキソール（10-デアセチルバカチンIII由来）、タキソールのホスホノオキシおよび炭酸塩誘導体、タキソール2',7-ジ(1,2-ベンセンジカルボン酸ナトリウム)、10-デスアセトキシ-11,12-ジヒドロタキソール-10,12(18)-ジエン誘導体、10-デスアセトキシタキソール、プロタキソール（2'-および/または7-0-エステル誘導体）、（2'-および/または7-0-炭酸塩誘導体）、タキソール側鎖の不斉合成、フルオロタキソール、9-デオキシタキサン、（13-アセチル-9

-デオキシバカチンIII）、9-デオキシタキソール、7-デオキシ-9-デオキシタキソール、10-デスアセトキシ-7-デオキシ-9-デオキシタキソール、水素またはアセチル基ならびにヒドロキシおよびtert-ブトキシカルボニルアミノを含む誘導体、スルホン化2'-アクリロイルタキソールおよびスルホン化2'-0-アシル酸タキソール誘導体、スクシニルタキソール、2'- $\gamma$ -アミノブチリルタキソールホルメート、2'-アセチルタキソール、7-アセチルタキソール、7-グリシンカルバメートタキソール、2'-OH-7-PEG(5000)カルバメートタキソール、2'-ベンゾイルおよび2'-7-ジベンゾイルタキソール誘導体、他のプロドラッグ（2'-アセチルタキソール；2',7-ジアセチルタキソール；2'スクシニルタキソール；2'-( $\beta$ -アラニル)-タキソール；2' $\gamma$ -アミノ酪酸（butyryl）タキソールホルメート；2'-スクシニルタキソールのエチレングリコール誘導体；2'-グルタリルタキソール；2'-(N,N-ジメチルグルシル)タキソール；2'-[2-(N,N-ジメチルアミノ)プロピオニル]タ

キソール：2' オルトカルボキシベンゾイルタキソール；タキソールの2' 脂肪族カルボン酸誘導体、プロドラック {2' (N,N-ジエチルアミノプロピオニル)タキソール、2' (N,N-ジメチルグリシル)タキソール、7(N,N-ジメチルグリシル)タキソール、2',7-ジ-(N,N-ジメチルグリシル)タキソール、7(N,N-ジエチルアミノプロピオニル)タキソール、2',7-ジ-(N,N-ジエチルアミノプロピオニル)タキソール、2'-(L-グリシル)タキソール、7-(L-グリシル)タキソール、2',7-ジ(L-グリシル)タキソール、2'-(L-アラニル)タキソール、7-(L-アラニル)タキソール、2',7-ジ(L-アラニル)タキソール、2'-(L-ロイシル)タキソール、7-(L-ロイシル)タキソール、2',7-ジ(L-ロイシル)タキソール、2'-(L-イソロイシル)タキソール、7-(L-イソロイシル)タキソール、2',7-ジ(L-イソロイシル)タキソール、2'-(L-バリル)タキソール、7-(L-バリル)タキソール、2',7-ジ(L-バリル)タキソール、2'-(L-フェニルアラニル)タキソール、7-(L-フェニルアラニル)タキソール、2',7-ジ(L-フェニルアラニル)タキソール、2'-(L-プロリル)タキソール、7-(L-プロリル)タキソール、2',7-ジ(L-プロリル)タキソール、2'-(L-リジル)タキソール、7-(L-リジル)タキソール、2',7-ジ(L-リジル)タキソール、2'-(L-グルタミル)タキソール、7-(L-グルタミル)タキソール、2',7-ジ(L-グルタミル)タキソール、2'-(L-アルギニル)タキソール、7-(L-アルギニル)タキソール、2',7-ジ(L-アルギ

ニル)タキソール}、修飾フェニルイソセリン側鎖を有するタキソールアナログ、タキソテレ (taxotere)、(N-デベンゾイル-N-tert-(ブトキシカルボニル)-10-デアセチルタキソール、ならびにタキサン (例えば、バカチンIII、セファロマンニン、10-デアセチルバカチンIII、ブレビフォリオール、ユナンタクシン、およびタクシン) が挙げられる。

微小管脱重合化剤 (または不安定化剤、または崩壊剤) の代表的な例としてノコダゾールが挙げられる (Dingら、J. Exp. Med. 171(3):715-727, 1990; Dottoiら、J. Cell Sci. Suppl. 15:75-84, 1991; Okaら、Cell Struc. Funct. 16(2):125-134, 1991; Wiemerら、J. Cell. Biol. 136(1)71-80, 1997); サイトカラシンB (Illingerら、Biol. Cell 73(2-3):131-138, 1991); ビンブラスチン (Dingら、J. Exp. Med. 171(3):715-727, 1990; Dirkら、Neurochem. Res. 15(11)1135-1139, 1990; Illingerら、Biol.

Cell 73(2-3):131-138, 1991; Wiemerら、J. Cell. Biol. 136(1):71-80, 1997); ビンクリスチン(Dirkら、Neurochem. Res. 15(11):1135-1139; Dingら、J. Exp. Med. 171(3):715-727, 1990); コルヒチン(Allenら、Am. J. Physiol. 261-(4 Pt. 1):L315-L321, 1991; Dingら、J. Exp. Med. 171(3):715-727, 1990; Gonzalezら、Exp. Cell. Res. 192(1):10-15, 1991; Stargellら、Mol. Cell. Biol. 12(4):1443-1450, 1992); CI 980(コルヒチンアナログ)(Garciaら、Anticancer Drugs 6(4):533-544, 1995; コルセミド(Ba rlowら、Cell. Motil. Cytoskeleton 19(1):9-17, 1991; Meschiniら、J. Microsc. 176(Pt. 3):204-210, 1994; Okaら、Cell Struct. Funct. 16(2):125-134, 1991); ポドフィロトキシン(Dingら、J. Exp. Med. 171(3):715-727, 1990); ペノルミル剤(Hardwic kら、J. Cell. Biol. 131(3):709-720, 1995; Shroら、Genes Dev. 5(4):549-560, 1991); オリザリン (oryzalin) (Stargellら、Mol. Cell. Biol. 12(4):1443-1450, 1992); マジュスクラミデC(Majusculamide C)(Mooreら、J. Ind. Microbiol. 16(2):134-143, 1996); デメコルチン(Van DolahおよびRamsdell, J. Cell. Physiol. 166(1):49-56, 1996; Wiemerら、J. Cell. Biol. 136(1):71-80, 1997); ならびにメチル-2-ベンズイミダゾールカルバメート(MBC)(Brownら、J. Cell. Biol. 123(2):387-403, 1993)。

### 処方

上記のように、本明細書中に記載される治療用抗微小管剤は、種々の様式で処方され得、したがってさらにキャリアーを含み得る。この点において、広範な種々のキャリアーが、ポリマー起源または非ポリマー起源のいずれかから選択され得る。

例えば、本発明の一つの実施態様では、広範な種々のポリマー性キャリアーは、上記の1つ以上の治療剤を含みおよび/または送達するように利用され得る(例えば、生分解性および非生分解性の組成物の両方を含む)。生分解性組成物の代表的な例として、アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、デンプン、セルロース(メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、セルロースアセテートスクシネート、ヒドロキシプロピルメチル

セルロースフタレート)、カゼイン、デキストラン、多糖、フィブリノーゲン、ポリ(D,Lラクチド)、ポリ(D,Lラクチド-co-グリコリド)、ポリ(グリコリド)、ポリ(ヒドロキシブチレート)、ポリ(アルキルカーボネート)、およびポリ(オルトエステル)、ポリエステル、ポリ(ヒドロキシ吉草酸)、ポリジオキサノン、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(リンゴ酸)、ポリ(タルトロン酸(tartronic acid))、ポリ無水物、ポリホスファゼン、ポリ(アミノ酸)およびそれらのコポリマーが挙げられる(一般的には、Illum, L., Davids, S.S.(編)「制御薬物送達におけるポリマー」Wright, Bristol, 1987; Arshady, J. Controlled Release 17:1-22, 1991; Pitt, Int. J. Phar. 59:173-196, 1990; Hollandら, J. Controlled Release 4:155-0180, 1986を参照のこと)。非生分解性ポリマーの代表的な例として、ポリ(エチレン-ビニルアセテート)(「EVA」)コポリマー、シリコーンゴム、アクリル性ポリマー(ポリアクリル酸、ポリメチルアクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリアルキルシノアクリレート)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド(ナイロン6,6)、ポリウレタン、ポリ(エステルウレタン)、ポリ(エーテルウレタン)、ポリ(エステル-ウレア)、ポリエーテル(ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(プロピレンオキシド)、プルロニック、ポリ(テトラメチレングリコール))、シリコーンゴム、およびビニルポリマー(ポリビニルピロリドン、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルアセテートフタレート))が挙げられる。アニオン性(例えば、アルギン酸、カラゲナン、カルボキシメチルセルロース、およびポリ(アクリル酸))またはカチオン性(例えば、キトサン、ポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、およびポリ(アリルアミン))のいずれかであるポリマーもまた開発され得る(一般的には、Dunnら, J. Applied Polymer Sci. 50:353-365, 1993; Casconeら, J. Materials Sci.: Materials in Medicine 5:770-774, 1994; Shiraishiら, Biol. Pharm. Bull. 16(11):1164-1168, 1993; ThacharodiおよびRao, Int'l J. Pharm. 120:115-118, 1995; Miyazakiら, Int'l J. Pharm. 118:257-263, 1995を参照のこと)。特に好ましいポリマー性キャリアとして、ポリ(エチレン-ビニルアセテート)、ポリ(D,L-乳酸)オリゴマーおよびポリマー、ポリ(L-乳酸)オリゴマーおよびポリマー

、ポリ（グリコール酸）、乳酸およびグリコール酸のコポリマー、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（バレロラクトン）、ポリ無水物、ポリ（カプロラクトン）またはポリ（乳酸）のポリエチレングリコールとのコポリマー、ならびにこれらのブレンドが挙げられる。

所望の放出特徴および／または特定の所望の特性を有するポリマー性キャリアが、種々の形態で形成され得る。例えば、ポリマー性キャリアは、特定の誘発事象（例えば、pH）への曝露の際に治療剤を放出するように形成され得る（例えば、Hellerら「化学的に自己調節された薬物送達系」Polymers in Medicine III, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, 175-188頁；Kangら, J. Applied Polymer Sci. 48:343-354, 1993；Dongら, J. Controlled Release 19:171-178, 1992；DongおよびHoffman, J. Controlled Release 15:141-152, 1991；Kimら, J. Controlled Release 28:143-152, 1994；Coenejo-Bravoら, J. Controlled Release 33:223-229, 1995；WuおよびLee, Pharm. Res. 10(10):1544-1547, 1993；Serresら, Pharm. Res. 13(2):196-201, 1996；Peppas「pHおよび温度感受性送達系の基礎」Gurmyら（編）, Pulsatile Drug Delivery, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993, 41-45頁；Doelker, 「セルロース誘導体」, 1993, PeppasおよびLanger（編）, Biopolymers 1, Springer-Verlag, Berlinを参照のこと）。pH感受性ポリマーの代表的な例として、ポリ（アタリル酸）およびその誘導体（例えば、ホモポリマー（例えば、ポリ（アミノカルボン酸））；

ポリ（アクリル酸）；ポリ（メチルアクリル酸））、このようなホモポリマーのコポリマー、ならびにポリ（アクリル酸）および上記のもののようなアクリルモノマーのコポリマーが挙げられる。他のpH感受性ポリマーとして、多糖（例えば、セルロースアセテートフタレート；ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート；ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート；セルロースアセテートトリメリート；およびキトサン）が挙げられる。さらに他のpH感受性ポリマーとして、pH感受性ポリマーおよび水溶性ポリマーの任意の混合物が挙げられる。

同様に、温度感受性であるポリマー性キャリアが形成され得る（例えば、Chenら「腫瘍薬物送達のための生体接着性ポリアクリル酸骨格へ融合された温度感受性プルロニックの新規のヒドロゲル」Proceed.Intern.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.22:167-168, Controlled Release Society, Inc., 1995; Okano, 「時間的な制御薬物送達のための刺激応答性ヒドロゲルの分子設計」Proceed.Intern.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.22:111-112, Controlled Release Society, Inc., 1995; Johnstonら, Pharm.Res.9(3):425-433, 1992; Tung, Int'l J.Pharm.107:85-90, 1994; HarshおよびGehrke, J.Controlled Release 17:175-186, 1991; Bacら, Pharm.Res.8(4)531-537, 1991; DinarvandおよびD'Emanuele, J.Controlled Release 36:221-227, 1995; YuおよびGrainger, 「新規の熱感受性両親媒性ゲル：ポリN-イソプロピルアクリルアミド-co-アクリル酸ナトリウム-co-n-N-アルキルアクリルアミドネットワーク合成および物理化学的特徴」Dept.of Chemical & Biological Sci., Oregon Graduate Institute of Science & Technology, Beaverton, OR, 820-821頁; ZhouおよびSmid, 「結合スターポリマーの物理的ヒドロゲル」Polymer Research Institute, Dept.of Chemistry, College of Environmental Science and Forestry, State Univ.of New York, Syracuse, NY, 822-823頁; Hoffmanら, 「刺激応答性ヒドロゲルにおける孔サイズおよび水「構造」の特徴付け」Center for Bioengineering, Univ.of Washington, Seattle, WA, 828頁; YuおよびGrainger, 「架橋N-イソプロピルアクリルアミドネットワークにおける熱感受性膨張反応：カチオン性、アニオン性、および両親媒性ヒドロゲル」Dept.of Chemical & Biological Sci., Oregon Graduate Institute of Science &

Technology, Beaverton, OR, 829-830頁; Kimら, Pharm.Res.9(3)283-290, 1992; Baeら, Pharm.Res.8(5):624-628, 1992; Konoら, J.Controlled Release 30:69-75, 1994; Yoshidaら, J.Controlled Release 32:97-102, 1994; Okanoら, J.Controlled Release 36:125-133, 1995; ChunおよびKim, J.Controlled Release 38:39-47, 1996; D'EmanueleおよびDinarvand, Int'l J.Pharm.118:237-242, 1995; Katonoら, J.Controlled Release 16:215-228, 1991; Hoffman, 「生物学

的に活性な種を含む熱可逆性ヒドロゲル」Migliaresiら(編), Polymers in Medicine III, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, 161-167頁; Hoffman, 「治療薬および診断薬における熱可逆性ポリマーおよびヒドロゲルの適用」Third International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, UT, 1987年2月24~27日, 297-305頁; Gutowskaら, J. Controlled Release 22:95-104, 1992; PalasisおよびGehrke, J. Controlled Release 18:1-12, 1992; Paavolaら, Pharm. Res. 12(12):1997-2002, 1995を参照のこと)。

熱ゲル化ポリマーおよびそれらのセラチン温度(LCST(°C))の代表的な例として、ホモポリマー(例えば、ポリ(N-メチル-N-n-ポリアタリルアミド)、19.8; ポリ(N-n-プロピルアクリルアミド)、21.5; ポリ(N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド)、22.3; ポリ(N-n-プロピルメタクリルアミド)、28.0; ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、30.9; ポリ(N, n-ジエチルアクリルアミド)、32.0; ポリ(N-イソプロピルメタクリルアミド)、44.0; ポリ(N-シクロプロピルアクリルアミド)、45.5; ポリ(N-エチルメチアクリルアミド)、50.0; ポリ(N-メチル-N-エチルアクリルアミド)、56.0; ポリ(N-シクロプロピルメタクリルアミド)、59.0; ポリ(N-エチルアタリルアミド)、72.0が挙げられる。さらに、熱ゲル化ポリマーは、上記のモノマー間でコポリマーを調製することによるか、またはこのようなホモポリマーを他の水溶性ポリマー(例えば、アクリルモノマー(例えば、アクリル酸およびその誘導体(例えば、メチルアクリル酸))、アクリレートおよびその誘導体(例えば、ブチルメタクリレート)、アクリルアミド、およびN-n-ブチルアクリルアミド)とを組み合わせることにより作製され得る。

熱ゲル化ポリマーの他の代表的な例として、セルロースエーテル誘導体(例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、41°C; メチルセルロース、55°C; ヒドロキシプロピルメチルセルロース、66°C; およびエチルヒドロキシエチルセルロース、ならびにプルロニック(例えば、F-127、10~15°C; L-122、19°C; L-92、26°C; L-81、20°C; およびL-61、24°C)が挙げられる。



広範な種々の形態（例えば、桿状デバイス、ペレット、スラブ、またはカプセルを含む）が、本発明のポリマー性キャリアにより形成され得る（例えば、Goodellら, Am.J.Hosp.Pharm.43:1454-1461, 1986; Langerら, 「ポリマーからの高分子の制御放出」 Biomedical polymers, Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use, Goldberg, E.P., Nalagim, A (編) Academic Press, 113-137頁, 1980; Rhineら, J.Pharm.Sci.69:265-270, 1980; Brownら, J.Pharm.Sci.72:1181-1185, 1983; および Bawaら, J.Controlled Release 1:259-267, 1985を参照のこと）。治療剤は、ポリマーのマトリックス内で吸蔵により連結され得るか、共有結合により結合され得るか、またはマイクロカプセル内にカプセル化され得る。本発明の特定の好ましい実施態様では、治療組成物は、非カプセル処方物（例えば、ミクロスフェア（サイズがナノメートルからマイクロメートルの範囲）、ペースト、種々のサイズの糸、フィルム、およびスプレー）において提供される。

好ましくは、本発明の治療組成物は、意図される使用に適切な様式で形成される。本発明の特定の局面では、治療組成物は生体適合性であり、そして数日から数ヶ月の期間にわたって1つ以上の治療薬剤を放出すべきである。例えば、7日～10日の期間にわたって治療剤（例えば、パクリタキセル）の10%、20%、または25%(w/v)を超えて放出する、「急速放出」または「バースト」治療組成物が提供される。このような「急速放出」組成物は、特定の実施態様では、化学療法レベル（適用可能な場合）の所望の薬剤を放出し得るべきである。他の実施態様では、7日～10日の期間にわたって治療剤の1%(w/v)未満を放出する、「低放出」治療組成物が提供される。さらに、本発明の治療組成物は、好ましくは、数ヶ月間安定であり、そして無菌条件下で生成され、そして維持され得るべきである。

本発明の特定の局面では、治療組成物は、特定の使用に依存して、50nm～500 $\mu$ mの範囲の任意のサイズで形成され得る。あるいは、このような組成物はまた、フィルムまたはコーティングに凝固する、「スプレー」として容易に適用され得る。このようなスプレーは、例えば、0.1 $\mu$ m～3 $\mu$ m、10 $\mu$ m～30 $\mu$ m、および3

0  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$ を含む、広範な多数のサイズのミクロスフェアから調製され得る。

本発明の治療組成物はまた、種々の「ペースト」またはゲル形態で調製され得る。例えば、本発明の1つの実施態様では、ある温度（例えば、37℃を超える温度（例えば、40℃、45℃、50℃、55℃、または60℃））で液体、そして別の温度（例えば、環境(ambient)体温または37℃より低い任意の温度）で固体または半固体である治療組成物が提供される。このような「熱ペースト」は、本明細書中に提供された開示があれば容易に作製され得る。

本発明のさらに他の局面では、本発明の治療組成物は、フィルムとして形成され得る。好ましくは、このようなフィルムは、一般的に、5、4、3、2、または1 mm厚未満、より好ましくは0.75mmまたは0.5mm厚未満、そして最も好ましくは500  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$ 厚未満である。このようなフィルムは、好ましくは曲げやすく、良好な引っ張り強さ（例えば、50N/cm<sup>2</sup>を超える、好ましくは100N/cm<sup>2</sup>を超える、より好ましくは150または200N/cm<sup>2</sup>を超える）、良好な接着特性を有し（すなわち、湿ったまたは濡れた表面に容易に接着する）、そして制御された浸透性を有する。

本発明のさらなる局面では、本発明の治療組成物は局所的適応に処方され得る。代表的な例として：エタノール；エタノールおよびグリコールの混合物（例えばエチレングリコール、またはプロピレングリコール）；エタノールおよびイソプロピルミリステート、またはエタノール、イソプロピルミリステートおよび水（例えば55:5:40）；エタノールおよびエイネオール (eineol) の混合物、またはD-リモネン（水を有する、または有さない）；グリコール（例えば、エチレングリコールまたはプロピレングリコール）ならびにプロピレングリコールのようなグリコールと水の混合物、ホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、Transcutol<sup>®</sup>、またはテルピノレン (terpinolene)；イソプロピルミリステートと1-ヘキシル-2-ピロリドンとの混合物、N-ドデシル-2-ペリジノン、または1-ヘキシル-2-ピロリドンが挙げられる。また、他の賦形剤（例えば、酸（例えば、オレイン酸、およびリノール酸）、ならびにセッケン（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム））がまた、上記に添加され得る。上記につい

てのより詳細な記載については、一般に、Hoelgaardら、J. Contr. Rel. 2:111, 1985; Linら、Pharm. Res. 8:938, 1991; Royら、J. Pharm. Sci. 83:126, 1991; Ogisoら、J. Pharm. Sci. 84:482, 1995; Sasakiら、J. Pharm. Sci. 80:533, 1991; Okabeら、J. Contr. Rel. 32:243, 1994; Yokomizoら、J. Contr. Rel. 38:267, 1996; Yokomizoら、J. Contr. Rel. 42:37, 1996; Mondら、J. Contr. Rel. 33:72, 1994; Michniakら、J. Contr. Rel. 32:147, 1994; Sasakiら、J. Pharm. Sci. 80:533, 1991, BakerおよびHadgraft、Pharm. Res. 12:993, 1995; Jastiら、AAPS Proceedings, 1996; Leeら、AAPS Proceedings, 1996; Ritschelら、Skin Pharmacol. 4:235, 1991; ならびにMcDaidおよびDeasy, Int. J. Pharm. 133:71, 1996を参照のこと。

本発明の特定の実施態様では、治療組成物はまた、界面活性剤（例えば、プルロニック（例えば、F-127、L-122、L-92、L-81、およびL-61）のようなさらなる成分を含み得る。

本発明のさらなる局面では、疎水性化合物を含みそして放出するように適合されるポリマー性キャリアが提供され、このキャリアは、炭水化物、タンパク質、またはポリペプチドと組み合わせた疎水性化合物を含む。特定の実施態様では、ポリマー性キャリアは、1つ以上の疎水性化合物の領域、ポケット、または顆粒を含む。例えば、本発明の1つの実施態様では、疎水性化合物は、疎水性化合物を含むマトリックスに取り込まれ、続いてこのマトリックスはポリマー性キャリアに取り込まれ得る。種々のマトリックス（例えば、炭水化物および多糖（例えば、デンプン、セルロース、デキストラン、メチルセルロース、およびヒアルロン酸）、タンパク質またはポリペプチド（例えば、アルブミン、コラーゲン、およびゼラチン）を含む）はこれに関して利用され得る。代替の実施態様では、疎水性化合物は、疎水性コア内に含まれ得、そしてこのコアは疎水性の殻内に含まれ得る。

本明細書中に記載される治療薬剤を含みおよび／または送達するために同様に利用され得る他のキャリアとして以下が挙げられる：ヒドロキシプロピル $\beta$ シク

ロデキストリン(CserhatiおよびHollo, Int. J. Pharm. 108:69-75, 1994)、リポソーム（例えば、Sharmaら、Cancer Res. 53:5877-5881, 1993; SharmaおよびStrau

binger, Pharm.Res.11(60):889-896, 1994; W093/18751; 米国特許第5,242,073号を参照のこと)、リポソーム/ゲル(W094/26254)、ナノカプセル(Bartoliら, J.Microencapsulation7(2):191-197, 1990)、ミセル(Alkan-Onyukselら, Pharm.Res.11(2):206-212, 1994)、インプラント(Jampelら, Invest.Ophthalmol.Vision Science 34(11):3076-3083, 1993; Walterら, Cancer Res.54:22017-2212, 1994)、ナノ粒子(ViolanteおよびLanzafame PAACR)、ナノ粒子-改変(米国特許第5,145,684号)、ナノ粒子(表面改変)(米国特許第5,399,363号)、タキソールエマルジョン/溶液(米国特許第5,407,683号)、ミセル(界面活性剤)(米国特許第5,403,858号)、合成リン脂質化合物(米国特許第4,534,899号)、気体媒介分散(米国特許第5,301,664号)、液体エマルジョン、泡、スプレー、ゲル、ローション、クリーム、軟膏、分散ベシクル、粒子または小滴、固体または液体エアゾール、マイクロエマルジョン(米国特許第5,330,756号)、ポリマー性殻(ナノカプセルおよびマイクロカプセル)(米国特許第5,439,686号)、表面活性剤中のタキソイドベース組成物(米国特許第5,438,072号)、エマルジョン(Tarrら, Pharm Res.4:62-165, 1987)、ナノスフェア(Haganら, Proc.Intern.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.22, 1995; Kwonら, Pharm Res.12(2):192-195; Kwonら, Pharm Res.10(7):970-974; Yokoyamaら, J.Contr.Rel.32:269-277, 1994; Grefら, Science 263:1600-1603, 1994; Bazileら, J.Pharm.Sci.84:493-498, 1994)、およびインプラント(米国特許第4,882,168号)を参照のこと)。

以下により詳細に議論されるように、治療組成物を形成するために本明細書中に記載されるキャリアのうちの1つに必要な応じて取り込まれる本発明の治療剤は、広範な種々の疾患を処置または予防するために調製され、そして利用され得る。

#### 炎症性疾患の処置または予防

上記のように、本発明は広範な炎症性疾患の処置方法または予防方法を提供し、この方法は、患者に抗微小管剤を投与する工程を包含する。処置され得る炎症性疾患の代表的な例には、以下が挙げられる。例えば、萎縮性胃炎、炎症性溶血性

貧血、移植片拒絶、炎症性好中球減少症、水疱性類天疱瘡、小児脂肪便症、脱髄性神経障害、皮膚筋炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎およびクローン病）、多発性硬化症、心筋炎、筋炎、鼻ポリープ、慢性静脈洞炎、尋常性天疱瘡、原発性糸球体腎炎、乾癬、外科的接着、狭窄、または再狭窄、強膜炎、硬皮症、湿疹（アトピー性皮膚炎、刺激性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎が挙げられる）およびI型糖尿病。

炎症性疾患の他の例には、以下が挙げられる、脈管炎（例えば、巨細胞性動脈炎（側鎖動脈炎、高安動脈炎）、結節性多発動脈炎、アレルギー性血管炎、および肉芽種症（チャーグーストラウス症候群）、脈管周囲炎重複症候群(polyangitis overlap syndrome)、過敏性血管炎（ヘーノホーシェーンライン紫斑病）、血清病、薬剤誘導性脈管炎、感染性脈管炎、新生物脈管炎、結合組織障害に関連する脈管炎、補体系の先天性欠損に関連する脈管炎、ヴェーゲナー肉芽種症、川崎病、中枢神経系脈管炎、バーガー病、および全身硬化）；消化管疾患（例えば、膵炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、原発性硬化胆管炎、特発性を含む任意の原因による良性狭窄症、（例えば、胆管狭窄症、食道狭窄症、十二指腸狭窄症、小腸狭窄症、または結腸狭窄症）；気道疾患（例えば、喘息、過敏性肺炎、石綿症、珪肺、および塵肺の他の形態、慢性気管支炎、および慢性閉塞性気道疾患）；鼻涙管疾患（例えば、特発性を含む全ての狭窄症の原因）；およびエウスタキオ管疾患（例えば、特発性を含む全ての疾患の原因）。

これらの疾患をさらに理解するため、代表的な炎症性疾患をさらに詳細に以下に述べる。

#### 1. 炎症性皮膚疾患（例えば、乾癬および湿疹）

本明細書中に提供される薬剤、組成物、および方法を用いることにより、広範な種々の炎症性皮膚疾患が、容易に処置または予防され得る。例えば、本発明の1つの実施態様においては、炎症性皮膚疾患（例えば、乾癬または湿疹）は、炎症部位（または、炎症の可能性のある部位）に微小管機能を阻害する薬剤を送達することによって、処置または予防され得る。

簡潔には、皮膚細胞は、通常2つの可能なプログラム（正常な増殖および創傷

治癒)をたどるように遺伝的にプログラムされている。正常な増殖パターンにおいては、皮膚細胞は、基底細胞層で産生され、次いで表皮を通過して皮膚表面まで上昇する。死細胞は、健常な皮膚から新しい細胞が産生されるのと同じ速度で剥落される。正常皮膚細胞のターンオーバー時間(すなわち細胞誕生から死までの時間)は、ほぼ28日である。創傷治癒の間、促進された増殖および修復が誘発され、皮膚細胞の迅速なターンオーバー(創傷の置換および修復)を生じさせ、血液の供給が増加し(増殖に関連した増加した代謝性要求を満たすため)、そして炎症を局在化させる。

多くの点で、乾癬は悪化した創傷治癒プロセスに類似している。皮膚細胞が(「ケラチノサイト」と呼ばれる)産生され、2~4日の短さで皮膚表面に押しやられる。表面の皮膚は、死細胞を十分に早く剥落させ得ず、そして過剰なケラチノサイトが蓄積し、増大した鱗状の病変を形成する。この増殖は、過剰に増殖したケラチノサイトを支持するために必要な栄養を提供するために確立された、真皮中の新しい血管(表皮の下の支持組織)によって支持される。同時に、リンパ球、好中球、およびマクロファージが、組織を侵襲し、炎症、腫脹、および痛みを引き起こし、そしてケラチノサイトの急激な増殖を増加させる増殖因子を潜在的に産生する。これら全ての細胞(ケラチノサイト、血管内皮細胞、および白血球)は、組織分解酵素、または疾患の進行および周辺組織の破壊を助けるタンパク質分解酵素を産生する。

上記で提供された組成物を用いて、炎症性皮膚病変を容易に処置し得る。特に、疾患を処置または予防するために、抗微小管剤を炎症部位(または炎症の潜在的部位)に直接投与する。適切な抗微小管剤は、上記で詳細に議論しており、例えば、タキサン(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)、カンフォテシン(camptothecin)、エルーテロビン(eleutherobin)、サルコジクチン(sarcodictyins)、エポシロン(epothilones) AおよびB、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、ツベルシジン(7-デアザアデノシン)、LY290181(2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルドニトリル)、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクロ-

ナ

ル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質、TALP）、低張性（190mosmol/L）条件により誘発される細胞膨張、インスリン（100nmol/L）またはグルタミン（10mmol/L）、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01（キネシン様タンパク質）、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素（例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン（extensin））、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質（例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン（ensconsin））、延長因子-1- $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）およびE-MAP-115）、細胞体（entities）（例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体）、内因性微小管構造（例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ）、安定な細管のみポリペプチド（例えば、STOP145およびSTOP220）、および有糸分裂力からの張力、ならびに上記のいずれかの任意のアナログおよび誘導体が挙げられる。特定の実施態様において、抗微小管剤は、パクリタキセル、カンフォテシン、またはエポシロン以外の薬剤である。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー性キャリアとの組成物として、あるいは上記および下記でより詳細に論じたりポソーム、クリーム、または軟膏の処方物で送達され得る。本発明の好適な実施態様において、薬剤または組成物は、局所的または皮下的投与のいずれかにて送達される。

乾癬の有効な抗微小管治療は以下の少なくとも一つを達成する：皮膚病変の数および重症度の減少、活性な疾患悪化の頻度および持続時間の減少、緩解した時間の長さの増加（すなわち、患者が病状を有さない場合の期間）、ならびに／または関連病状の重症度または持続期間の減少（例えば、関節痛および関節の腫脹、中心骨格痛、腸の病状）。

医療的に、処置は皮膚病変のサイズまたは数の減少を起こし、皮膚病状（患部皮膚の痛み、灼熱感および出血）の減少および／または関連病状（例えば関節の発赤、熱、腫脹、下痢、腹痛）の減少を起こす。病理学的に、抗微小管剤は少なくとも以下のうちの一つを産生する：ケラチノサイト増殖の阻害、皮膚炎症の減少（例えば、以下に対する衝撃によって：誘引性因子、および増殖因子、抗原提

示、活性酸素腫の産生ならびにマトリクスメタロプロテイナーゼ)、ならびに皮膚血管形成の阻害。

抗微小管剤は、上記目的を達成するための任意の様式において投与され得るが、好ましい方法には、局所投与および全身投与が挙げられる。局所的な疾患を有する患者は、乾癬病変に直接塗布される局所用パクリタキセルクリーム、軟膏、または緩和薬を投与され得る。例えば、疾患の重症度、および患者の処置への応答に依存して、パクリタキセルを0.01重量%~10重量%を含む局所クリームが投与され得る。好ましい実施態様においては、パクリタキセルを0.1重量%~1重量%を含む局所調製物が、乾癬病変に投与される。あるいは、適切な薬学的ビヒクルにおけるパクリタキセルの直接皮内注射が、個々の病変の治療技術に用いられ得る。

広範囲の疾患または真皮外の症状（例えば、乾癬関節炎、ライター症候群、付随する脊椎炎、付随する炎症性腸疾患）を有する患者においては、全身のパクリタキセル処置が投与され得る。例えば、静脈内パクリタキセル処方物での断続的な処置は、治療応答および患者の許容範囲に依存して、 $10\sim 75\text{mg}/\text{m}^2$ の用量で投与され得る；等価な経口用の調製物もまた、この徴候に適している。他の抗微小管剤は、薬剤の効力および許容量について調整された「パクリタキセル等価物」用量で投与される。

他の状態もまた、局所的抗微小管剤からの利益を受け得、これには以下が含まれる：湿疹の疾患（アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、湿疹）、免疫水疱性疾患、前悪性上皮性腫瘍、基底細胞悪性腫瘍、扁平上皮癌、角化棘細胞腫（keratocanthoma）、悪性黒色腫およびウイルス性いぼ。パクリタキセルを0.01重量%~10重量%を含む局所用クリーム、軟膏、または緩和薬がこれらの状態の管理に適切であり得る。

## 2. 多発性硬化症

本発明の他の局面において、抗微小管剤は多発性硬化症の治療および予防に利用され得る。簡潔には、多発性硬化症（MS）は、ヒト中枢神経系の荒廃的な脱髄性疾患である。この病因および病原は未知であるが、遺伝的、免疫学的および環



境因子が役割を担っていると考えられる。疾患の経過において、運動機能の喪失を起こす、MS患者の脳における進行性の脱髄がある。ミエリンの喪失に関わる正

確な機構は理解されていないが、ミエリン破壊の領域には、星状細胞の増殖および蓄積の増加がある。これらの部位において、マクロファージ様活性、および少なくとも部分的にミエリン鞘の分解の原因である増加したプロテアーゼ活性がある。

抗微小管剤は、疾患を処置または予防するために、炎症部位（または炎症の潜在的部位）に投与され得る。適切な抗微小管剤は、上記で詳細に議論しており、例えば、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル）、カンフォテシン（camptothecin）、エルーテロビン（eleutherobin）、サルコジクチン（sarcodictyins）、エポシロン（epothilones）AおよびB、ジスコデルモリド、重水（D<sub>2</sub>O）、ヘキシレングリコール（2-メチル-2,4-ペンタンジオール）、ツベルシジン（7-デアザアデノシン）、LY290181（2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルボニトリル）、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質、TALP）、低張性（190mosmol/L）条件により誘発される細胞膨張、インスリン（100nmol/L）またはグルタミン（10mmol/L）、ダイニン結合、ジベレリン、XCHOI（キネシン様タンパク質）、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素（例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン（extensin））、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質（例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン（ensconsin）、延長因子-1- $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）およびE-MAP-115）、細胞体（entities）（例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体）、内因性微小管構造（例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ）、安定な細管のみポリペプチド（例えば、STOP145およびSTOP220）、および有糸分裂力からの張力、ならびに上記のいずれかの任意のアナログおよび誘導体が挙げられる。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー性キャリアとの組成物として、あるいは上

記および下記により詳細に論じたりポソーム処方物で送達され得る。本発明の特定の実施態様において、薬剤または組成物は、経口的に、静脈内的に、または直接（好適には、超音波、CT、蛍光、MRI、または内視鏡誘導を用いて）、疾患部位

に投与され得る。

多発性硬化症の有効な抗微小管治療は、以下の1つ以上を達成する：症状の重度の減少；疾患悪化の持続時間の減少；疾患の緩解期間／症状のない期間の頻度および持続期間の増加；治療した損傷および障害の予防；ならびに／または疾患の慢性的な進行の予防／減弱。臨床的には、これは視覚的な症状（視力喪失、複視）、歩行失調（衰弱、身体中心軸の不安定性、感覚喪失、痙性、反射亢進、機敏さの喪失）、上肢機能不全（衰弱、痙性、感覚喪失）、膀胱機能不全（尿意促進、失禁、排尿躊躇、残尿感）、うつ病、感情不安定、および認識障害の改善となる。病理学的に、この処置は以下の症状を1つ以上減少する、例えば、ミエリン喪失、血液脳関門の機能停止、単核細胞の血管周辺への浸潤、免疫系の異常、神経膠症の瘢痕の形成、および星状細胞の増殖、金属プロテアーゼの産生、伝達速度の障害。

抗微小管剤は、上記の目的を達成するために任意の様式で投与され得る。しかし好ましい投与方法には、静脈内、経口または皮下、筋肉内、あるいは髄腔内注射が挙げられる。抗微小管剤は、疾患の進行、疾患緩解の延長、または活性化された疾患における症状の減少を予防するために長期低容量治療として投与され得る。あるいは、治療剤は「パルス (pulse)」治療として、急性の活性化疾患の緩解を誘導するために、高容量で投与され得る。これらの終点を達成し得る最小用量が用いられ得、そして患者、疾患の重篤度、投与された薬剤の処方、そして投与経路によって変化し得る。例えばパクリタキセルでは、全身長期低用量治療は連続して $10\text{mg}/\text{m}^2 \sim 50\text{mg}/\text{m}^2$ のパクリタキセルが1から4週間毎に治療応答に依存して投与され得る；全身高容量「パルス」治療は、 $50\text{mg}/\text{m}^2 \sim 250\text{mg}/\text{m}^2$ で、1～21日毎に1～6周期で投与され得る。他の抗微小管剤は薬剤の効力および許容度を調整された等価の用量で投与され得る。

### 3. 関節炎

炎症性関節炎は、特に高齢者の数の増加があげられる先進国において深刻な健康問題である。例えば、炎症性関節炎の1つの形態である、慢性関節リウマチ（RA）は、多システムの長期、再発性、炎症性の原因未知の疾患である。多数の

臓器が影響され得るが、RAは基本的に、ときどき影響された関節の破壊、および硬直を引き起こす長期滑膜炎の重篤な形態である（Robbins Pathological Basis of Disease, by R.S.Cotran, V.Kumar, および S.L.Robbins, W.B.Saunders Co., 1989）。病理学的に、本疾患は、滑膜の著しい肥厚によって特徴付けられる（これは関節領域に広がる絨毛突起、滑膜細胞内層の多層化（滑膜細胞増殖）、白血球（マクロファージ、リンパ球、形質細胞、およびリンパ濾胞；「炎症性滑膜炎」と呼ばれる）の滑膜の浸潤、ならびに滑膜内における細胞性ネクロシスを伴うフィブリンの沈着を形成する）。このプロセスの結果として形成された組織はパンヌスと呼ばれ、そしてパンヌスは最終的に関節領域を満たすように増殖する。パンヌスは滑膜炎の進行に必要な血管形成のプロセスを介して新規血管の広範なネットワークを発達させる。消化酵素（マトリクスメタロプロテイナーゼ（例えば、コラゲナーゼ、ストロメライシン（stromelysin））およびパンヌス組織の細胞からの炎症プロセスの他のメディエータ（例えば、過酸化水素、活性酸素、リソソーム酵素、およびアラキドン酸代謝産物）の放出は、軟骨組織の進行性の破壊を導く。パンヌスは、関節軟骨に侵入し、軟骨組織の腐食および断片化を導く。最終的に関与した関節の線維性の強直および最終的には骨性強直を有する軟骨下骨の腐食（erosion）がある。

一般的に、最終的に証明されてはいないが、RAは自己免疫疾患であり、そして多数の異なる関節性刺激が、免疫遺伝学的に感受性の宿主における免疫応答を活性化させると考えられている。外因性感染性因子（エプスタインバー（Ebstein-barr）ウイルス、風疹ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、マイコプラズマなど）および内因性タンパク質（コラーゲン、プロテオグリカン、改変型免疫グロブリン）の両方は、不適当な宿主免疫応答を引き起こす原因物質として結びつけられている。刺激物質とは関係なく、

自己免疫は疾患の進行に役割を担っている。特に、関連抗原は、抗原提示細胞（滑膜中のマクロファージ、または樹状細胞）によって取り込まれ、プロセッシングされ、そしてTリンパ球に提示される。T細胞は、細胞性免疫応答を開始し、そしてBリンパ球のプラズマ細胞への増殖、および分化を刺激する。最終結果は、宿主組織に対する過剰な不適切な免疫応答である（例えば、II型コラーゲンに対

する抗体、自己IgGのFc部分に対する抗体（「リウマチ因子」と呼ばれる））。これはさらに免疫応答を増強し、そして軟骨組織の破壊を促進する。一旦、このカスケードが開始されると、軟骨細胞破壊の多数のメディエータが慢性関節リウマチの進行の原因となる。

従って、本発明の一つの局面においては、患者に治療的有効量の抗微小管剤を投与する工程を包含する、炎症性関節炎（例えば、慢性関節リウマチ）を処置または予防する方法が提供される。炎症性関節炎には、以下を含む多様な状態が挙げられるが、これらに限定されない。慢性関節リウマチ、全身性エリトマトーデス、全身性硬化（硬皮症）、混合結合組織病、シェーグレン症候群、硬直性脊椎炎、ベーチェット病、サルコイドーシス、および変形性関節症—これらの全てが顕著な症状として、炎症した、有痛性の関節という特徴を有する。本発明の好ましい実施態様において、抗微小管剤は、関節内注射によって、外科用ペーストとして直接関節に投与され得るか、または別の経路（例えば、全身に、または経口的に）で投与され得る。

適切な抗微小管剤は、上記で詳細に議論しており、例えば、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル（docetaxel））、カンフォテシン（camptothecin）、エルーテロビン（eleutherobin）、サルコジクチン（sarcodictyins）、エポシロン（epothilones）AおよびB、ジスコデルモリド、重水（D<sub>2</sub>O）、ヘキシレングリコール（2-メチル-2,4-ペンタンジオール）、ツベルシジン（7-デアザアデノシン）、LY290181（2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルボニトリル）、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質

、TALP)、低張性(190mosmol/L)条件により誘発される細胞膨張、インスリン(100nmol/L)またはグルタミン(10mmol/L)、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01(キネシン様タンパク質)、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素(例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン(extensin))、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質(例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン(ensconsin)、延長因

子-1- $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )、およびE-MAP-115)、細胞体(entities)(例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体)、内因性微小管構造(例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ)、安定な細管のみポリペプチド(例えば、STOP145およびSTOP220)、および有糸分裂力からの張力、ならびに上記のいずれかの任意のアナログおよび誘導体が挙げられる。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー性キャリアとの組成物として、あるいは上記および下記でより詳細に論じたりポソーム処方物中で送達され得る。特定の抗体に関して、抗微小管剤は、パクリタキセル、カンフォテシン、またはエポシロン以外の薬剤である。

炎症性関節炎のための効果的な抗微小管治療は、以下の1つ以上を達成する：

(i) 症状(患部関節の疼痛、膨張、および圧痛；朝のこわばり(morning stiffness)、虚弱(weakness)、疲労、食欲不振、体重減少)の重篤度の減少；(ii) 疾患の臨床徴候(関節莢膜の肥厚、滑膜肥大、関節の浸出、軟組織の痙縮、可動範囲の減少、強直症、および固定化関節の変形)の重篤度の減少；(iii) 疾患(リウマチ性結節、血管炎、肺結節、間質性線維症、心外膜炎、上強膜炎、虹彩炎、Felty症候群、骨粗鬆症)の関節外症状の減少；(iv) 疾患の緩解/徴候のない期間の頻度および持続時間の増大；(v) 固定化障害(fixed impairment)および能力障害(disability)の予防；ならびに/または(vi) 疾患の慢性的進行の予防/軽減。病理学的には、炎症性関節炎の効果的な抗微小管治療は、以下のうちの少なくとも1つを生成する：(i) 炎症性応答の減少、(ii) 炎症性サイトカイン(例えば、IL-1、TNF $\alpha$ 、FGF、VEGF)の活性の破壊、(iii) 滑膜細胞増殖の阻害、(iv) マトリックスメタロプロテイナーゼ活性の遮断、および/ま

たは(v)新血管形成の阻害。抗微小管剤は、上記の結果を達成するための最小用量で全身的に(経口的に、静脈内に、または筋肉内注射もしくは皮下注射によって)投与される。わずか少数の患部関節を有する患者、または限定された数の関節においてより顕著な疾患を有する患者については、抗微小管剤は、患部関節に直接注入(関節内注射)され得る。

#### 4. ステントおよび移植片を含むインプラントおよび外科用または医学的デバイ

##### ス

種々のインプラント、外科用デバイスまたはステントが、本明細書中に提供される任意の抗微小管剤でコートされるか、またはそうでなければそれを含有し、そして/または放出するように構築され得る。代表的な例には、心血管デバイス(例えば、移植可能な静脈カテーテル、静脈ポート、トンネル化静脈カテーテル、長期注入ラインまたはポート(肝動脈注入カテーテルを含む)、ペースメーカーワイヤ、移植可能な細動除去器);神経学的/神経外科的デバイス(例えば、心室腹膜分路、心室心房分路、神経刺激デバイス、椎弓切除後硬膜外線維症を防止するためのデュアルパッチおよびインプラント、連続的くも膜下注入のためのデバイス);胃腸デバイス(例えば、長期留置カテーテル、栄養管、門脈体静脈分路、腹水のための分路、薬物送達のための腹膜移植植物、腹膜透析カテーテル、ヘルニアのための移植可能メッシュ、外科的接着(メッシュを含む)を防止するための懸濁液または固体インプラント);尿生殖器デバイス(例えば、子宮インプラント(子宮内デバイス(IUD)および子宮内膜肥厚を予防するデバイスを含む)、ファロピウス管インプラント(可逆性滅菌デバイスを含む)、ファロピウス管ステント、人工括約筋、尿失禁のための尿道周囲インプラント、子宮ステント、長期留置カテーテル、膀胱増大、または精管吻合のためのラップ(wrap)または副子);眼科インプラント(例えば、血管新生緑内障のためのマルチノ(multino)インプラントおよび他のインプラント、翼状片のための薬物溶出コンタクトレンズ、失敗した涙嚢鼻腔吻合術のための副子、角膜新血管形成のための薬物溶出コンタクトレンズ、糖尿病性網膜症のためのインプラント、高リスク角膜移植のための薬物溶出コンタクトレンズ);耳鼻咽喉科デバイス(例えば、耳小骨

インプラント、トランステンパニック (transtempanic) 排出の代わりとしての  
膠状耳もしくは慢性耳炎のためのEustachian管副子もしくはステント) ; 形成外  
科インプラント (例えば、胸下もしくは腺下アプローチもしくは乳房切除術後に  
おけるゲルまたは生理食塩水含有乳房インプラント、または顎インプラントに応  
答する繊維質の痙縮の予防)、ならびに整形外科インプラント (例えば、セメン  
ト化整形外科プロステシス) が含まれる。

適切な抗微小管剤は、上記に詳細に議論され、そして例えば、タキサン(例え  
ば、パクリタキセルおよびドセタキセル(docetaxel))、カンポテシン(camptothec  
in)、エレウテロビン(eleutherobin)、サルコジクチン(sarcodictyin)、エポチ  
ロン (epothilone) AおよびB、ディスコデルモリド(discodermolide)、重水 ( $D_2O$ )、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、ツベルシジン  
(tubercidin) (7-デアザアデノシン)、LY290181(2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-  
ナフト(1,2,-b)ピラン-3-カルドニトリル)、フッ化アルミニウム、エチレングリ  
コールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノ  
クローナル抗イディオタイプ抗体、微小管凝集促進タンパク質 (タキソール様タ  
ンパク質、TALP)、低張 (190mosmol/L) 条件によって誘導される細胞膨張、イ  
ンスリン (100nmol/L)、またはグルタミン (10mmol/L)、ダイニン結合、ジベ  
レリン、XCH01 (キネシン様タンパク質)、リゾホスファチジン酸、リチウムイ  
オン、植物細胞壁成分 (例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン(extensin)  
)、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパ  
ク質 (例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン、延長因子1  $\alpha$  (EF-  
1  $\alpha$ )、およびE-MAP-115)、細胞体 (例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパ  
ク質、および動原体)、内因性微小管構造 (例えば、軸糸構造、プラグ、および  
GTPキャップ)、安定な細管のみポリペプチド (例えば、STOP145およびSTOP220  
)、および有糸分裂応力からの張力、ならびに上記の任意のもののアナログおよ  
び誘導体。このような因子は、特定の実施態様において、上記および以下での両  
方でより詳細に記載されるように、組成物として、ポリマー性キャリアとともに  
、またはリポソーム処方物中で送達され得る。特定の実施態様 (例えば、ステン

トの場合)において、抗微小管剤は、パクリタキセル、カンボテシン、またはエポチロン以外の薬剤である。

インプラントおよび他の外科的または医学的デバイスは、本発明の抗微小管組成物または抗微小管剤で、例えば、以下を含む種々の様式：(a) インプラントまたはデバイスに、抗微小管剤または組成物を、(例えば、インプラントまたはデバイスをポリマー/薬物フィルムでスプレーすることにより、またはポリマー/薬物溶液中にインプラントもしくはデバイスを浸けることにより、または他の共有結合もしくは非共有結合手段によりのいずれかで)直接固定することによっ

て；(b) インプラントもしくはデバイスを基質(例えば、抗微小管組成物(または上記の抗微小管剤)を吸着するヒドロゲル)で被覆することによって；(c) 抗微小管組成物で被覆した縫合糸(または、縫合糸へと成形されたポリマー自体)をインプラントもしくはデバイスに織り合わせることによって；(d) インプラントもしくはデバイスを抗微小管組成物から構成されるかもしくは被覆されたスリーブまたはメッシュに挿入することによって；(e) インプラントもしくはデバイス自体を抗微小管剤もしくは組成物で構築することによって；または(f) そうでなければインプラントもしくはデバイスが抗微小管剤を放出するように適合させることによって、被覆され得る。本発明の好ましい実施態様において、組成物は保存の間および挿入の時点で、インプラントまたはデバイスにしっかりと接着しているべきである。抗微小管剤または組成物はまた、好ましくは、保存の間、挿入の前、または(必要な場合)体内に挿入された後に体温まで温められた場合に、分解すべきではない。さらに、好ましくは、インプラントもしくはデバイスを、抗微小管剤を均一に分布して、一方でステントの輪郭を変化させないで、滑らかかつ均等に被覆すべきである。本発明の好ましい実施態様において、抗微小管剤または組成物は、一旦それが配置されたならば、抗微小管剤の、インプラントまたはデバイスの周りの組織への均一な、予測可能な、延長した放出を提供すべきである。血管ステントについて、上記の特性に加えて、組成物は、ステントを血栓形成性にする(血液凝固が形成されるようにする)べきではなく、または血流において(ステント自体が被覆されていない場合に引き起こすと予



想されるよりも) 有意な乱流を生じるべきではない。

ステントの場合には、広範な種々のステントが、以下を含む本明細書中に提供される抗微小管剤：食道ステント、胃腸管ステント、血管ステント、胆管ステント、結腸ステント、膵臓ステント、尿管および尿道ステント、流涙ステント、Eustachian管ステント、ファロピウス管ステント、ならびに気管/気管支ステントを含有および/または放出するように開発され得る。ステントは、市販の供給源から容易に得られるか、または周知の技術に従って構築され得る。ステントの代表的な例には、「Hydrogel Adhesive」と題された米国特許第4,768,523号；「Expandable Intraluminal Graft, and Method and Apparatus for Implanting and

Expandable Intraluminal Graft」と題された米国特許第4,776,337号；「Endovascular Stent and Delivery System」と題された米国特許第5,041,126号；「Indwelling Stent and Method of Use」と題された米国特許第5,052,998号；「Self-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length」と題された米国特許第5,064,435号；「Water-insoluble Polysaccharide Hydrogel Foam for Medical Applications」と題された米国特許第5,089,606号；「Nitinol Stent for Hollow Body Conduits」と題された米国特許第5,147,370号；「Indwelling Stent」と題された米国特許第5,176,626号；「Biodegradable Polymeric Endoluminal Sealing Process」と題された米国特許第5,213,580号；および「Method and Apparatus for Treatment of Focal Disease in Hollow Tubular Organs and Other Tissue Lumens」と題された米国特許第5,328,471号に記載されるものが含まれる。

本発明の他の局面において、身体通路の管腔を拡張するための方法であって、上記通路を拡張するように上記通路にステントを挿入する工程を包含し、ここで上記ステントが一般に管状構造を有し、上記構造の表面が、抗微小管組成物（または、抗微小管剤単独）で被覆（またはそうでなければ放出するように適合されている、方法が提供される。種々の実施態様が以下に記載され、ここで身体通路の管腔は、胆管の、胃腸管の、食道の、気管/気管支の、尿道の、または血管の障害を排除するために拡張されている。

一般に、ステントは、処置される部位または疾患に関わらず、類似の様式で挿

入される。簡単には、予挿入検査、通常は診断画像化手順、内視鏡検査、または手術の時点での直接的可視化が、ステント挿入の適切な位置を決定するために一般にまず行われる。次いで、ガイドワイヤが、病変または挿入の予定の位置に先行され、そしてこれを通じて、ステントがその潰れた形態で挿入されることを可能にする送達カテーテルが通される。代表的には、ステントは、それらが小さな腔を通して小さなカテーテルによって挿入され、次いで一旦それらが所望の位置に到達したら、より大きい直径に拡張し得るように、圧縮され得る。一旦拡張されると、ステントは物理的には通路の壁を押し広げ、そしてそれを開けたままに保持する。このようにして、それらは小さな開口を介して挿入し得、そしてなお大きな直径の腔または通路を開けたままにすることができる。ステントは、自己

拡張的（例えば、WallstentおよびGianturcoステント）、バルーン拡張性（例えば、PalmaZステントおよびStreckerステント）であり得、または温度変化によって移植され得る（例えば、Nitinolステント）。

ステントは、代表的には、ステントを正確に処置されるべき器官の近くに配置するように特に注意しながら、放射線学的制御または直接可視の制御の下で操作されて配置される。次いで、送達カテーテルは除去され、足場としてステントをそれ自体で静置しているようにする。挿入後の検査（通常はX線）が、しばしば適切に位置されたことを確認するために使用される。

本発明の好ましい実施態様において、胆管の障害を排除するための方法であって、胆管ステントを胆管通路に挿入する工程を包含する方法が提供される。ここで、上記ステントは、一般に管状構造を有し、上記構造の表面は、胆管の障害が排除されるように、上記の薬剤または組成物で被覆（またはそうでなければ上記の薬剤または組成物を放出されるように適合）されている。簡単には、一般的な胆管の腫瘍の過増殖は、生命とは適合し得ない進行性の胆汁鬱滞性の黄疸を生じる。一般には、肝臓から十二指腸へ胆汁を排出する胆管システムは、（１）胆管細胞（胆管癌）から構成される腫瘍、（２）胆管を侵襲する腫瘍（例えば、膵癌）、または（３）外因的な圧力を発揮し、そして胆管を圧縮する腫瘍（拡張したリンパ節）によって最もしばしば妨害される。

原発性胆管腫瘍、および胆管樹(biliary tree)の圧迫を引き起こす他の腫瘍は共に、本明細書において記載されるステントを利用して処置され得る。原発性胆管腫瘍の1つの例は、腺ガン(これは、総肝管の分岐に見出される場合、Klatskin腫瘍とも呼ばれる)である。これらの腫瘍はまた、胆管ガン、総胆管肝管ガン(choledocholangiocarcinomas)、または胆管系の腺ガンとも呼ばれる。胆管に影響を及ぼす良性腫瘍(例えば、胆管系の腺腫)、ならびに希な症例において胆管の扁平上皮ガンおよび胆嚢の腺ガンもまた、胆管樹の圧迫を引き起こし得、したがって胆管閉塞を生じる。

胆管樹の圧迫は、最も一般的には、胆管を圧縮し、したがってこれを閉塞する、肝臓および膵臓の腫瘍に起因する。膵臓由来の腫瘍のほとんどが、膵管の細胞から生じる。これは、高度に致命的な形態のガン(すべてのガンによる死亡の

5%；米国において、1年あたり26,000の新たな症例)であり、平均生存期間は6ヶ月であり、1年後の生存率はわずかに10%である。これらの腫瘍が、膵頭に位置する場合、これらは頻繁に胆管閉塞を引き起こし、そしてこれは、患者のクオリティーオブライフを著しく損なう。すべてのタイプの膵臓腫瘍が、一般に、「膵臓ガン」と呼ばれるが、腺ガン、腺扁平上皮ガン、嚢胞腺ガン、および腺房細胞ガンを含む組織学的なサブタイプが存在する。上記のような肝臓腫瘍もまた、胆管樹の圧迫を引き起こし、したがって胆管の閉塞を引き起こし得る。

本発明の1つの実施態様において、いくつかの方法のうちの1つで、胆ステントは胆の小路にまず挿入される。いくつかの方法とは、すなわち、注射針を腹壁および肝臓を通して挿入することによって上端から(経皮経肝胆管造影または「PTC」)；口、胃および十二指腸を通じて挿入した内視鏡を介して胆管にカニューレーションすることによって下端から(内視鏡的逆行性胆道造影または「ERCP」)；または外科的手順の間の直接切開によるものである。予備挿入検査、PTC、ERCP、または手術時の直接視覚化は、一般に、ステント挿入に適切な位置を決定するために実施されるべきである。次いで、ガイドワイアは、病変を通じて進められ、そしてステントがしぼんだ形態で挿入され得るように、これを越えて送達カテーテルを通す。診断検査がPTCである場合、ガイドワイアおよび送達カテーテルは

、腹壁を介して挿入される。他方、元の検査がERCPである場合、ステントは口を介して配置され得る。次いで、ステントは、それが胆管中で狭窄部を横切って正確に配置されるように特別の注意を払って放射線学的、内視鏡的、または直接視覚的制御下で配置される。次いで、送達カテーテルは、ステントを、胆管開口を維持する足場としての状態にしたままで、取り出される。ステントが適切な位置にあることを実証するために、さらなる胆管造影が実施され得る。

本発明のなお別の実施態様において、食道閉塞を排除するための方法が提供され、この方法は、食道閉塞が排除されるように、食道ステントを食道に挿入する工程を包含し、このステントはほぼ管状構造を有し、この構造の表面は、抗微小管剤または上記の組成物でコーティングされている(または、そうでなければ、これを放出するように適合されている)。簡潔には、食道は、食物および液体を口から胃まで輸送する中空の管である。食道ガンまたは隣接する器官に生じたガ

ン(例えば、胃ガンまたは肺ガン)による侵襲は、食物も唾液も嚥下を不可能にする。この実施態様において、予備挿入検査(通常はバリウム嚥下または内視鏡観察)は、一般に、ステント挿入に適切な位置を決定するために、実施されるべきである。次いで、カテーテルまたは内視鏡は、口を通して配置され得、そしてガイドワイアが障害を通過して進められる。ステント送達カテーテルは、放射線学的または内視鏡的制御下で、ガイドワイア上を通過させられ、そしてステントは、食道中の狭窄部を横切って正確に配置される。挿入後検査(通常、バリウム嚥下、X線)が、適切な位置を確認するために利用され得る。

本発明の他の実施態様において、結腸閉塞を排除するための方法が提供され、この方法は、結腸閉塞が排除されるように、結腸ステントを結腸に挿入する工程を包含し、このステントがほぼ管状の構造を有し、この構造の表面は、抗微小管剤または上記の組成物でコーティングされている(または、そうでなければ、これを放出するように適合されている)。簡潔には、結腸は、消化された食物および排泄物を、小腸から肛門まで輸送する中空の管である。直腸および/または結腸ガン、または隣接する器官に生じたガン(例えば、子宮、卵巣、膀胱ガン)による侵襲は、腸からの便の排泄を不可能にする。本発明の実施態様において、予備

挿入検査(通常、バリウム浣腸または結腸内視鏡検査)は、一般に、ステント挿入に適切な位置を決定するために、実施されるべきである。次いで、カテーテルまたは内視鏡は肛門を通じて配置され、そしてガイドワイアは、障害を通過して進められる。ステント送達カテーテルは、放射線学的または内視鏡的制御下でガイドワイア上を通過させられ、そしてステントは、結腸または直腸の狭窄部を横切って正確に配置される。挿入後検査(通常、バリウム浣腸、X線)が、適切な位置を確認するために利用され得る。

本発明の他の実施態様において、気管/気管支閉塞を排除するための方法が提供され、この方法は、気管/気管支閉塞が排除されるように、気管/気管支ステントを気管または気管支に挿入する工程を包含し、このステントがほぼ管状の構造を有し、この構造の表面は、抗微小管剤または上記の組成物でコーティングされている(または、そうでなければ、これを放出するように適合されている)。簡潔には、気管および気管支は、空気を口および鼻から肺まで運ぶ管である。ガンに

よる気管の妨害、隣接する器官に生じたガン(例えば、肺ガン)による侵襲、または軟骨軟化(軟骨環の弱体化)に起因する気管もしくは気管支の虚脱は、呼吸を不可能にする。本発明の実施態様において、予備挿入検査(通常は内視鏡検査)は、一般に、ステント挿入に適切な位置を決定するために、実施されるべきである。次いで、カテーテルまたは内視鏡は、口を通じて配置され、そしてガイドワイアが障害を通過して進められる。次いで、送達カテーテルは、しぼんだステントの挿入が可能になるように、ガイドワイア上を通過させられる。ステントは、それが狭窄部を横切って正確に配置されるように、放射線学的または内視鏡的制御下で配置される。次いで、送達カテーテルが、ステントを、それ自体の上に足場として残して取り出され得る。挿入後検査(通常は、気管支鏡検査)が、適切な位置を確認するために利用され得る。

本発明の別の実施態様において、尿道閉塞を排除するための方法が提供され、この方法は、尿道閉塞が排除されるように、尿道ステントを尿道に挿入する工程を包含し、このステントがほぼ管状の構造を有し、この構造の表面は、抗微小管剤または上記の組成物でコーティングされている(または、そうでなければ、こ

れを放出するように適合されている)。簡潔には、尿道は、膀胱から陰茎を通じて排水する管である。尿道は前立腺を通過するので前立腺肥大に起因する尿道の外因性狭窄は、60歳を越えた実質的にすべての男性に生じ、徐々に排尿困難を引き起こす。本実施態様において、予備挿入検査(通常は内視鏡検査または尿道写真)は、一般に、ステント挿入に適切な位置を決定するために、まず実施されるべきである。適切な位置は、下端が外尿道括約筋の上部、そして上端が膀胱頸と同一平面近傍である。次いで、内視鏡またはカテーテルは、陰茎開口部を通じて配置され、そしてガイドワイアが膀胱中に進められる。次いで、送達カテーテルは、ステント挿入を可能とするように、ガイドワイア上を通過させられる。次いで、送達カテーテルが取り出され、ステントが適所で展開される。挿入後検査(通常は、内視鏡検査または逆行性尿道写真)が、適切な位置を確認するために利用され得る。

本発明の別の実施態様において、血管閉塞を排除するための方法が提供され、この方法は、血管閉塞が排除されるように、血管ステントを血管に挿入する工程

を包含し、このステントがほぼ管状の構造を有し、この構造の表面は、抗微小管剤または上記の組成物でコーティングされている(または、そうでなければ、これを放出するように適合されている)。簡潔には、ステントは、血管形成に失敗した部位で再発性狭窄(本物)を防止するため、血管形成術で処置した場合に失敗する可能性がある狭窄を処置するため、および手術後の狭窄(例えば、透析移植片狭窄(本物))を処置するために、種々の配列の血管(動脈および静脈の両方)に配置され得る。適切な部位の代表例には、腸骨、腎、および冠状動脈、上大静脈、および透析移植片が挙げられる。1つの実施態様において、ステントの配置部位を位置決めするために、血管形成術がまず実施される。これは、代表的には、X線が採用されるので、放射線不透過性造影剤を、動脈または静脈中に挿入されたカテーテルを通じて注射することによって達成される。次いで、カテーテルは、経皮的または外科的のいずれかで、大腿動脈、上腕動脈、大腿静脈、もしくは上腕静脈に挿入され得、そしてX線透視ガイダンスの下で、カテーテルを血管系を通じて操縦することによって適切な血管中に進められ得る。次いで、ステ

ントは血管狭窄を横切って配置され得る。挿入後血管造影図はまた、適切な位置を確認するために利用され得る。

狭窄の研究に通常使用される動物モデルは、ラット頸動脈モデルである。ここで、総頸動脈は、外頸動脈を通じて導入したバルーンカテーテルの内腔通過によって内皮を剥離される(Clowesら、Lab. Invest. 49(2)208-215, 1983)。2週間で、頸動脈は、平滑筋細胞収縮に起因して顕著に狭くなっているが、2～12週間の間に、中膜は厚さが2倍になり、管腔サイズの減少を導く。

#### 5. 炎症性腸疾患

本明細書において提供される薬剤、組成物および方法を利用して、腸の広範な種々の炎症性疾患が処置または予防され得る。炎症性腸疾患は、胃腸管が関与する未知の病因の慢性炎症性障害群に対する一般的な用語である。慢性IBDは2群(潰瘍性結腸炎およびクローン病)に分割される。西ヨーロッパおよび米国において、潰瘍性結腸炎は、100,000人あたり6～8症例の発生率を有する。

この疾患の原因は未知のままであるが、遺伝的要因、感染要因、免疫学的要因および心理学的要因がすべて、原因として提案されている。潰瘍性結腸炎において、表面の潰瘍化を導く、結腸粘膜が関与する炎症性反応が存在する。好中球浸潤が共通し、そして繰り返される炎症性エピソードが結腸の線維症および短縮を導く。長年の潰瘍性結腸炎により、表面の上皮が異形成になり得、そして結局は悪性となり得る。クローン病は、すべての層の腸壁を通じて広がる慢性的な炎症によって特徴付けられる。疾患が進行すると、腸は肥厚し、管腔の狭窄が生じる。粘膜の潰瘍化が生じ、そして潰瘍が粘膜下組織および筋層に浸透し、フィステルおよび裂溝を形成し得る。

抗微小管剤は、いくらかの様式で炎症性腸疾患を処置するために使用され得る。詳細には、抗微小管剤は、疾患を処置するために、炎症部位(または炎症の可能性のある部位)に投与され得る。適切な抗微小管剤は上記で詳細に議論されており、これには、例えば、タキサン(taxane)(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)、カンポセシン(camptothecin)、エレウセロビン(eleutherobin)、サルコジクチン(sarcodictyin)、エポチロン(epothilone) A および B、ジスコデ

ルモリド(discodermolide)、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、ツベルシジン(tubercidin)(7-デアザアデノシン)、LY290181(2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフソ(1,2-b)ピラン-3-カルドニトリル)、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管組立促進タンパク質(タキソール様タンパク質、TALP)、低張(190オスモル/L)条件、インスリン(100nmol/L)またはグルタミン(10mmol/L)によって誘導される細胞腫脹、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01(キネシン様タンパク質)、リゾホスファチド酸、リチウムイオン、植物細胞壁成分(例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン(extensin))、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管結合タンパク質(例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン(ensconsin)、延長因子-1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )およびE-MAP-115)、細胞性実体(例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体)、内因性微小管構造(例えば、アクソネーム構造、plug、およびGTPキャップ)、stable tubule only polypeptide(例えば、STOP145およびSTOP220)および有糸分裂力由来の緊張、ならびに上記の

いずれかのアナログおよび誘導体が含まれる。特定の実施態様内で、このような因子は、ポリマー性キャリアとともに、または上記および下記の両方でより詳細に議論されるリポソーム処方物において、組成物として送達され得る。

IBDの研究のための理想的なモデルは、ヒト疾患と実質的に同一である、天然に生じるかまたは誘導可能な動物疾患であるべきである。現在、わずかに2つの天然に生じる、腸炎症のモデル(共に霊長類種)が存在する。そこでは、原因微生物は見出されていない。第1は、cotton-topタマリンは、同定可能な病原体と関連しない、自発的結腸炎の高い有病率を有し、そしてヒトにおいてと同様に、疾患プロセスの活性が自発的に大きくなったり小さくなったりする(Madaraら、Gastroenterology、88:13-19, 1985)。別の自発的慢性結腸炎もまた、幼若アカゲサル(rhesus macaque)において生じる(Adlerら、Gastroenterology、98:A436, 1990)。多くの実験的に誘導される結腸動物モデルがある。マウス、ラット、モルモ



ット、およびウサギにおいて、結腸炎は、硫酸処理した多糖(カラゲナンアミロペクチンスルフェート、硫酸デキストラン)の経口投与(MarcusおよびWatt、Lancet 2:489-490, 1969)、化学刺激物(希釈酢酸)の直腸注射(MacPhersonおよびPfeiffer、Digestion 17:135-150, 1978)、およびジニトロクロロベンゼン(GlickおよびFalchuk、Gut 22:120-125, 1981)もしくはトリニトロベンゼンスルホン酸(RabinおよびRogers、Gastroenterology 75:29-33, 1978)に対する遅延過敏反応により誘導され得る。

IBDについてpathogenomicな特徴も特異的な診断試験もないので、この疾患の管理における抗微小管剤の有効性は臨床的に決定される。IBDに対する効果的な抗微小管治療は、以下のうちの少なくとも1つで達成される：発作の頻度の減少、寛解期で過ごした時間量(すなわち、患者に症状が見られない期間)の増大、および/または関連する症状発現(膿瘍形成、フィステル形成、結腸ガン、腸穿孔、腸閉塞、中毒性巨大結腸、末梢関節炎、強直性脊椎炎、胆石症、硬化性胆管炎、肝硬変、結節性紅斑、虹彩炎、ブドウ膜炎、上強膜炎、静脈血栓症)の重篤度または持続時間の減少。具体的には、血液混じりの下痢、腹痛、発熱、体重減少、直腸出血、テネスマス、および腹部膨満のような症状が減少するか軽減される。

抗微小管剤は、上記の終点を達成するために任意の様式で投与され得るが、好

ましい方法は、経口、直腸、または管周投与(好ましくは、超音波、CT、X線透視、MRI、または内視鏡のガイダンスで；こらはまた、腹部手術と同時に直接投与により達成され得る)を包含する。いくつかの患者において、因子の静脈内、皮下、または筋肉内注射もまた、疾患を処置するために使用され得る。広範囲に及ぶかまたは腸外の症状を有する患者において、全身処置(例えば、経口、静脈内、皮下、筋肉内注射)が適切である。好ましい実施態様において、パクリタキセルは、治療応答および患者の耐性に依存して、1～4週間毎に、 $10\sim75\text{mg/m}^2$ の用量で、経口的に投与され得る。重篤な急性再燃を処置するために、経口的(または静脈内)に与えられる、より高用量の $50\sim250\text{mg/m}^2$ のパクリタキセルが、「パルス」治療として投与され得る。限局された直腸疾患(潰瘍性結腸炎患者の95%において直腸が関与)を有する患者において、局所的パクリタキセルは、直腸ク

リームまたは坐薬として投与され得る。例えば、0.01重量%~10重量%パクリタキセルを含有する局所クリームが、疾患の重篤度および患者の治療応答に依存して投与され得る。好ましい実施態様において、0.1重量%~1重量%のパクリタキセルを含む局所的調製物が、必要に応じて、毎日直腸に投与され得る。周管パクリタキセル(すなわち、腸の外部表面または腸間膜表面への薬物の投与)が活性な疾患を有する腸の領域に投与され得る。好ましい実施態様において、0.5重量%~20重量%のパクリタキセルが、(実施例に記載のように)ポリマー性キャリア中に充填され、そして所定の期間にわたって薬物を放出する「ペースト」、「フィルム」、または「ラップ」として腸管膜表面に適用される。すべての実施態様において、他の抗微小管剤は、この薬剤の効力および耐性能について調整した等価用量で投与される。

## 6. 外科的手順

上記のように、抗微小管剤および組成物は、広範な種々の外科的手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの局面において、(例えば、スプレーまたはフィルムの形態の)抗微小管剤または組成物は、正常な周囲組織を悪性組織から隔離するため、および/または周囲組織への疾患の拡大を予防するために、腫瘍の除去の前に、所定の領域にコーティングするかまたはスプレーするために利

用され得る。本発明の他の局面において、(例えば、スプレー形態の)抗微小管剤または組成物は、腫瘍をコーティングするため、または所望の場所で疾患を阻害するために、内視鏡的手順を介して送達され得る。本発明のなお別の局面において、本発明の抗微小管剤または組成物でコーティングされているかまたはこれらを放出するように適合されている外科用メッシュは、外科用メッシュが利用され得る任意の手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの実施態様において、抗微小管組成物を負荷された外科用メッシュは、腹部ガン切除手術(例えば、結腸切除に続く)の間に、その構造に対して支持を提供するため、および所定量の抗微小管剤を放出するために利用され得る。

本発明のさらなる局面において、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供され、この方法は、その部位でのガンの局所的再発が阻害されるように、切除に続

いて、抗微小管剤または上記のような組成物を、腫瘍の切除縁に投与する工程を包含する。本発明の1つの実施態様において、抗微小管組成物(または抗微小管剤単独)は、腫瘍切除部位に直接投与される(例えば、抗微小管組成物または薬剤を、腫瘍の切除縁に綿棒で塗布するか、ブラシで塗布するか、またはそうでなければコーティングすることによって適用される)。あるいは、抗微小管組成物または薬剤は、投与前に公知の外科用ペースト中に組み込まれ得る。本発明の特に好ましい実施態様においては、抗微小管組成物は、悪性疾患に対する部分的な乳房切除術後、および神経外科手術の後に適用される。

本発明の1つの局面では、抗微小管剤または組成物(上記に記載のような)を、広範な種々の腫瘍(例えば、乳房腫瘍、頭部腫瘍および頸部腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍および肝腫瘍を含む)の摘出縁に投与し得る。例えば、本発明の1つの実施態様では、抗微小管剤または組成物を、腫瘍の再発を阻害するように、切除に引き続いて神経性腫瘍の部位に投与し得る。簡潔には、脳は高度に機能的に配置されており;すなわち、特定の解剖学的領域の各々は、特定の機能を実施するように特殊化されている。それゆえ、脳症状の型よりもしばしば重要であるのは脳症状の部位である。重要な領域での比較的小さな病変は、あまり重要ではない領域でのかなり大きな病変よりも、はるかに打撃的であり得る。同様に、脳表面の病変は、外科的に切除することは容易であり得るが、同じ腫瘍でも脳の深部に位置

するものは、容易には切除し得ない(そこに到達するためには、あまりにも多くの生命維持に必要な構造を切開しなければならない)。あるいは、良性腫瘍でさえも、いくつかの理由に関しては危険であり得る:それは、重要な領域で増殖し、重大な損傷を引き起こし得る;たとえそれらを外科的切除により治療しても、これは可能ではあり得ない;そして最終的には、検査をしていないものが残っている場合は、頭蓋内圧の上昇を引き起こし得る。頭蓋は、拡張し得ない密閉空間である。それゆえ、ある位置で何かが増殖すると、何か他のものが別の位置に圧迫されなければならない。その結果、頭蓋における圧力が上昇するか、または頭蓋内圧力が上昇する。このような状況は、未処置のまま放置されると、生命維持

に必要な構造が圧迫され得、結果として死に終わる。中枢神経系(CNS)悪性腫瘍の発生率は、100,000例につき8～16例である。原発性悪性脳腫瘍の予後は、陰鬱なものである。外科的切除後でさえも、平均生存率は、1年未満である。これらの腫瘍、特に神経膠腫は、主に、外科的摘出後の疾患の本来の病巣の2cm以内に再発する局所的疾患である。

本明細書中に記載の薬剤、組成物、および方法を利用して治療し得る脳腫瘍の代表的な例には、以下が挙げられる：膠細胞腫瘍（例えば、未分化星状細胞腫、多形の神経膠芽腫、極細胞性(pilocytic)星状細胞腫、乏突起細胞腫、上衣細胞腫、粘液乳頭型脳室上衣細胞腫、上衣下細胞腫(subependymoma)、脈絡叢乳頭腫）；神経腫瘍（例えば、神経芽細胞腫、神経節芽細胞腫、神経節細胞腫、および髄芽腫）；松果体腫瘍（例えば、松果体芽細胞腫およびピネオサイトーマ）；髄膜腫瘍（例えば、髄膜腫、髄膜性血管外皮細胞腫、髄膜肉腫）；神経鞘細胞の腫瘍（例えば、シュワン細胞腫（神経線維鞘腫(neurolemoma)）および神経線維腫）；リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫（多数のサブタイプ、原発性および続発性の両方を含む））；先天異常性(malformative)腫瘍（例えば、頭蓋咽頭腫、類表皮嚢胞、類皮嚢胞、および膠質嚢胞）；ならびに転移性腫瘍（これは、実質的に任意の腫瘍に由来し得、最も一般的には、肺腫瘍、乳房腫瘍、黒色腫、腎腫瘍、および胃腸管肺瘍に由来する））

適切な抗微小管剤は、上記で詳細に議論されており、そして例えば、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル(docetaxel)）、カンボテリン

エルーテロビン(erubulin)、サルコジクチン(sarcodictyins)、エポチロン(epothilone) A および B、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、ツベルシジン(7-デアザアデノシン)、LY290181(2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルドニトリル、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシニルイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イデオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質(タキソール様タンパク質、TALP)、低張(190mosmol

/L)状態により誘導された細胞膨張、インスリン(100nmol/L)またはグルタミン(10mmol/L)、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01(キネシン様タンパク質)、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁成分(例えば、ポリLリジンおよびエクステンシン)、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質(例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン、延長薬剤-1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )およびE-MAP-115)、細胞体(例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質、および動原体)、内因性微小管構造(例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ)、ポリペプチドのみの安定な管(stable tubule only polypeptide)(例えば、STOP145およびSTOP220)および有糸分裂力の張力、ならびに上記の任意のアナログおよび誘導体)が挙げられる。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー性キャリアとともに、または上記および下記でより詳細に議論されるリポソーム処方物中の組成物として送達され得る。特定の実施態様では、抗微小管剤は、パクリタキセル、カンポテシン、またはエポチロン以外の薬剤である。

## 7. 外科的癒着

本発明の別の局面では、抗微小管剤を患者に投与することにより、外科的癒着を処置および/または予防するための方法が提供される。簡潔には、外科的癒着形成は、通常は別々である体組織がともに増殖する複雑なプロセスである。これらの手術後癒着は、主要な婦人科的手術を受ける患者の60%から90%に生じる。組織乾燥、虚血、熱性障害、感染または異物の存在の結果として、外科的外傷は、組織癒着形成のための刺激として長い間認識されてきた。これらの癒着は、失敗

した外科的治療の主要な原因である。そして、腸閉塞および不妊の主要な原因である。他の癒着を処置された合併症には、慢性骨盤痛、尿道閉塞、および排尿機能障害が挙げられる。

一般的に、癒着形成は、脈管透過性の上昇、およびフィブリノーゲン流入およびフィブリン堆積を生じるような因子が放出される炎症性反応である。この堆積は、隣接の組織を架橋するマトリクスを形成する。線維芽細胞は蓄積して、マト

リクスに付着し、コラーゲンを沈着し、そして血管新生を誘導する。この事象のカスケードが、外科手術後4～5日以内に予防され得る場合、次いで、癒着形成が阻害される。

従って、上記のように、本発明は、外科的癒着を処置および/または予防するための方法を提供する。広範の種々の動物モデルが、特定の治療的組成物または処置措置を評価するために利用され得る。簡潔には、腹膜癒着は、通常は2つの隣接する表面を含む重篤な損傷を与えられた結果として動物に生じる。虚血に起因するか、または異物の導入の結果としての傷害は、機械的なものであり得る。機械的な傷害は、腸の粉碎(Choateら、Arch. Surg. 88:249～254, 1964) および腸壁の外層から剥がすか、または削り落とすこと(Gustavssonら、Acta. Chir. Scand. 109:327～333, 1995)を含む。腸のループに主要な脈管を分割すると、虚血を誘導する(Jamesら、J. Path. Bact. 90:279～287, 1965)。領域に導入され得る異物には、タルカム(Grcenら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133:544～550, 1970)、ガーゼスポンジ(LehmanおよびBoys、Ann. Surg 111:427～435, 1940)、毒性化学物資(Chancy、Arch. Surg. 60:1151～1153, 1950)、バクテリア(Mo inら、Am. J. Med. Sci. 250:675～679, 1965)、および糞便(Jackson、Surgery 44:507～518, 1958)が挙げられる。

現在では、代表的な癒着予防モデルは、ウサギ子宮(Linskyら、J. Reprod. Med. 32(1):17～20, 1987)、ウサギ子宮角の剥離を含むウサギ子宮角モデル、子宮の剥離および非血管形成(decascularization) (Wisemanら、J. Invest. Surg. 7:527～532, 1994)を含む非血管形成改変モデル、ならびに腹膜頂部のパッチの切除および盲腸の剥離を含むウサギ盲腸側壁モデル(Wisemen and Johns, Fertil. Steril. 増補:25S, 1993)を含む。

癒着を処置するための代表的な抗微小管剤は、上記で詳細に議論されており、タキサン(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル(docetaxel))、カンフォテシン(camptothecin)、エルーテロビン(eleutherobin)、サルコジクチン(sarcodictyins)、エポシロン(epothilones) AおよびB、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、

ツベルシジン (7-デアザアデノシン)、LY290181 (2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルボニトリル)、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質 (タキソール様タンパク質、TALP)、低張性 (190mosmol/L) 条件により誘発される細胞膨張、インスリン (100nmol/L) またはグルタミン (10mmol/L)、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01 (キネシン様タンパク質)、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素 (例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン)、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質 (例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン (ensconsin)、延長因子-1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) および E-MAP-115)、細胞独立体(entities) (例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体)、内因性微小管構造 (例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ)、ポリペプチドのみの安定な管 (例えば、STOP145およびSTOP220)、および有糸分裂力からの張力、ならびに上記のいずれかの任意のアナログおよび誘導体を含む。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー製キャリアとの組成物として、または上記および下記でより詳細に議論したようなリポソーム処方物で送達され得る。特定の実施態様において、抗微小管剤は、パクリタキセル、カンフォテシン、またはエポシロン以外の薬剤である。

本明細書中で提供される薬剤、組成物および方法を利用すると、広範な種々の外科的癒着および外科手術の合併症が、処置または予防され得る。癒着形成または所望されない癒組織蓄積/封入が、種々の外科的手順を困難にする。上記のように、外科的癒着は、腹腔もしくは骨盤腔における実質的に任意の開放性の外科的手順または内視鏡の外科的手順を困難にする。外科的移植片の封入はまた、乳

房再建手術、関節置換手術、ヘルニア改善手術、人工的脈管移植手術、および脳外科手術を困難にする。各々の場合において、移植片は、外科的移植片 (例えば、乳房移植片、人工関節、外科手術用メッシュ、脈管移植片、硬膜パッチ) の機能を損なうかまたは減じる線維性結合組織被膜によりカプセル化されることにな

る。慢性の炎症および癒痕はまた、慢性の副鼻腔炎を治すかまたは慢性炎症（例えば、異物、感染（真菌性、マイコバクテリア））の他の領域を切除する外科的手術の間に生じる。

抗微小管剤は、以上の終点を達成するために任意の様式で投与され得る。しかし、好ましい方法は、管周囲の投与を含む（外科的手術時または内視鏡、超音波、CT、MRI、または蛍光透視鏡ガイダンスを用いる時のいずれかに直接適用）；外科的移植片を「コーティング」すること；および手術部位に薬物を溶出するポリマー性移植片を配置すること。好ましい実施態様では、0.5重量%～20重量%のパクリタキセルが、ポリマー性キャリアに充填され（以下の実施例に記載されるように）、そして管周囲（腸間膜）の表面に、外科的癒着の発生率が減少されるような期間にわたって薬剤を放出する「ペースト」、「フィルム」、または「ラップ」として適用される。内視鏡手順の間、内視鏡における送達部分を介して、手術の間に処置される腹腔および骨盤器官の腸間膜に、パクリタキセルポリマー調製物をスプレーとして適用する。特定の好ましい実施態様において、管周囲の組成物は、1重量%～5重量%のパクリタキセルである。別の好ましい実施態様では、0.1%～20%のパクリタキセルを含むポリマー性コーティングが、外科的移植片（例えば、乳房移植片、人工関節、脈管移植片）の表面に、移植片近傍におけるカプセル化/不適切な癒痕を予防するために適用される。なお別の好ましい実施態様では、0.1重量%～20重量%のパクリタキセルを含むポリマー性移植片が、炎症、癒着形成、または癒痕の再発が減少されるように、手術部位に直接（例えば、湾曲腔（sinus cavity）、胸腔、腹腔、または脳外科手術の間に手術部位に直接）適用される。全ての実施態様において、他の抗微小管剤は、薬剤の力価および許容性を調節した等価用量で投与される。

#### 8. 気道の慢性炎症疾患

本発明の他の局面では、抗微小管剤（および組成物）は、気道の慢性炎症疾患のような疾患を処置または予防するために利用され得る。詳細には、抗微小管剤は、疾患を処置するために、炎症部位（または炎症の可能性のある部位）に適用され得る。適切な抗微小管剤は、上記で詳細に議論されており、そして例えば、



タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル（docetaxel））、カンフォテシン（camptothecin）、エルーテロビン（eleutherobin）、サルコジクチン（sarcodictyins）、エポシロン（epothilones）AおよびB、ジスコデルモリド、重水（D<sub>2</sub>O）、ヘキシレングリコール（2-メチル-2,4-ペンタンジオール）、ツベルシジン（7-デアザアデノシン）、LY290181（2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルボニトリル）、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスタシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質、TALP）、低張性（190mosmol/L）条件により誘発される細胞膨張、インスリン（100nmol/L）またはグルタミン（10mmol/L）、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01（キネシン様タンパク質）、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素（例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン）、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質（例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン（ensconsin））、延長因子-1- $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）およびE-MAP-115）、細胞独立体（entities）（例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体）、内因性微小管構造（例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ）、ポリペプチドのみの安定な管（例えば、STOP145およびSTOP220）、および有糸分裂力からの張力、ならびに上記のいずれかの任意のアナログおよび誘導体を含む。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー性キャリアとの組成物として、または上記および下記でより詳細に議論したようなリポソーム処方物で送達され得る。本発明の特定の好ましい実施態様において、薬剤または組成物は、鼻腔内に、全身に、吸入により、局所的に（例えば、鼻ポリープの場合に）、または湾曲腔に投与され得る。

### 喘息

本発明の特定の局面において、抗微小管剤は、喘息を処置または予防するために利用され得る。手短には、喘息は、自発的に、または処置に応答して解消し得る気道閉塞の再発性エピソードによって特徴付けられる状態である。その正確な

病因は知られていないが、その状態は、悪化した気管支収縮、および集団の5%に影響を及ぼす刺激薬に対する免疫応答である。喘息に有効な抗微小管治療は、1つ以上の病理学的状態（例えば、炎症細胞（T細胞、肥満細胞、好酸球）の浸潤および活性を低減すること、気道上皮の増殖および肥厚を減少させること、気道壁における平滑筋細胞増殖および肥厚を阻害すること、気道管腔における粘液分泌を低減させること、炎症を誘導および永続化し、そして気道分泌腺の過形成および肥厚を阻害する炎症性サイトカイン（IL-3、IL-4、IL-5、GMSF）の活性をブロックすること）を改変する。

臨床的には、喘息のための有効な抗微小管治療は、以下の内の1つ以上を達成する：症状の重篤度低減する、増悪の持続期間を減少する、疾患の寛解器官の頻度および持続期間を増加する、固定した欠陥および障害を予防する、ならびに呼吸困難、咳、およびぜん鳴の慢性の進行を予防する；一方で、低酸素、 $FEV_1$ （2分の1の強制された(forced)呼気容量）、気道および低炭酸／呼吸性アルカローシスに対する耐性を改善する、ならびにV：Q（通気：灌流）ミスマッチを低減する。

抗微小管剤は、上記の終点を達成するために任意の様式で投与され得る。投与の好ましい方法は、吸入処置（例えば、メーター用量呼吸器、ネブライザー、気管内チューブを介する、微粒子の吸入薬）および全身性処置（静脈内注射、皮下注射、もしくは筋肉内注射、または経口調製）を含む。全身性処置は、重篤に悪化した患者に、または吸入治療が適切でない場合に投与される。臨床的または病理学的改善を生じ得る最小の用量が使用される。例えば、パクリタキセルについて、全身性慢性低用量治療は、応答に依存して1～4週間毎に $10\sim 50\text{mg}/\text{m}^2$ で投与され得；高用量「パルス」治療は、急性の疾病患者において $50\sim 250\text{mg}/\text{m}^2$ で投与され得る。吸入治療について、0.01%～1%のパクリタキセルが、上記の送達ビヒクル／処方物を介して直接的に吸入され得る。このことは、気道へ直接的に、 $1\sim 50\text{mg}/\text{m}^2$ のパクリタキセルの送達を生じる。この用量は、応答に従って滴下

される。他の抗微小管剤は、薬剤の能力および寛容性に適合した等価の用量で投

与され得る。

#### 慢性閉塞性肺疾患 (COPD)

COPDは、(慢性気道閉塞を導く) 種々の状態(慢性気管支炎、喘息性気管支炎、慢性閉塞性気管支炎、および気腫)を含む。これらの状態は、重篤な障害を引き起こし得、そして米国において4番目に主要な死因である。臨床的には、すべては、呼吸困難、咳、ぜん鳴、および気道の再発性感染によって特徴付けられる。疾患の徴候は、減少したFDV<sub>i</sub>、増加した残存容量、V:Qミスマッチ、および低酸血症を含む。病理学的には、増加した粘液産生、粘液腺の過形成、増加したプロテアーゼ(主に、エラスターゼ)活性、気道の炎症、および肺胞壁の破壊である。広範な病因(喫煙が最も一般的である)にもかかわらず、上記の任意の症状、徴候、または病理学的プロセスを改善することは、好ましくは、状態に影響を与え;従って、COPDに有効な抗微小管治療は、上記のうちの少なくとも1つを改変する。抗微小管剤での処置は、喘息について上記のように投与される:吸入されるパクリタキセルは、 $1 \sim 50 \text{mg/m}^2$ で、必要とされる場合は繰り返し与えられ、全身性パクリタキセル治療については、 $10 \sim 50 \text{mg/m}^2$ が、慢性投与において1~4週間毎に与えられるか、または急性の疾病患者において「パルス」として $50 \sim 250 \text{mg/m}^2$ が与えられる。他の抗微小管剤は、臨床的等価用量で投与される。

#### 9. 狭窄、新生物性疾患、および閉塞

上記のように、本発明は、身体の通路の閉塞に関連する広範な種々の疾患(例えば、脈管性疾患、新生物性閉塞、炎症性疾患、および感染性疾患を含む)を処置または予防するための方法を提供する。

例えば、本発明の1つの局面において、本明細書中に記載のような広範な種々の抗微小管剤および組成物を利用して、脈管系の閉塞を引き起こす脈管性疾患を処置し得る。そのような疾患の代表的な例は、以下を含むが、これらに限定されない全ての脈管(任意の動脈、静脈、または移植片の周囲):冠状動脈、大動脈、腸骨動脈、頸動脈、共通大腿動脈、表在(superficial)大腿動脈、膝窩動脈、お

および移植片吻合の部位のアテローム性動脈硬化症;血管痙攣(例えば、冠状血管

痙攣およびレーノー病)；再狭窄(以前の介入(例えば、バルーン血管形成、バイパス手術、ステント挿入、および移植片挿入)の部位での脈管の閉塞)；炎症および自己免疫状態(例えば、側頭動脈炎、脈管炎)を含む。

手短には、アテローム性動脈硬化症のような脈管疾患において、白血球、特に単球およびTリンパ球は、内皮細胞に、特に動脈分枝の位置にて接着する。内皮への接着後、白血球は、ケモスタット刺激(chemostatic stimuli)に応答して内皮細胞管壁を横切って移動し、そして平滑筋細胞と共に動脈壁の内膜に蓄積する。アテローム性動脈硬化症発生のこの初期の病巣は、「脂肪縞(fatty streak)」として公知である。脂肪縞内の単球はマクロファージへ分化し；そしてマクロファージおよび平滑筋細胞は、連続的に脂肪およびリポタンパク質を取り、泡沫細胞になる。

マクロファージが蓄積する場合、上層の内皮は、機械的に破壊されるようになり、そして酸化脂質、酸素由来フリーラジカル、およびマクロファージによって放出されるプロテアーゼによって化学的に改変されるようになる。泡沫細胞は、内皮表面を侵食し、脈管壁の微小潰瘍を引き起こす。潜在的なトロンボゲン形成内皮下組織(例えば、コラーゲンおよび他のタンパク質)の、血流の成分への曝露は、血小板の、破壊された内皮の領域への接着を生じる。血小板接着および他の事象は、この環境(milieu)への増殖因子(PDGF、血小板活性化因子(PAF)、IL-1、およびIL-6を含む)の生成および放出を誘発する。これらのパラクリン剤は、脈管平滑筋細胞(VSMC)の移動および増殖を刺激すると考えられている。

正常な(罹患していない)血管壁において、VSMCは、収縮性表現型、および有糸分裂活性の低い指数を有する。しかし、血小板によって放出されるサイトカインおよび増殖因子の影響下で、マクロファージおよび内皮細胞VSMCは、成熟収縮性細胞から未成熟分泌細胞への表現型変化を経る。形質転換したVSMCは、血管壁の中膜で増殖し、内膜に移動し、内膜において増殖し続け、そして大量の細胞外マトリクスを生じる。これは、成長中の脈管病巣を、線維性プラークに形質転換する。分泌VSMCによって生成された細胞外マトリクスは、コラーゲン、エラスチン、糖タンパク質、およびグリコサミノグリカンを含み、コラーゲンは、アテロ

ーム性動脈硬化症プラークの主要な細胞外マトリクス成分を含む。エラスチンおよびグリコサミノグリカン、リポタンパク質を結合し、そしてまた病巣の成長に寄与する。線維性プラークは、平滑筋細胞および上層のマクロファージマクロファージを含む、種々の厚さの高密度な結合組織の線維性キャップ、T細胞、および細胞外物質からなる。

PDGFに加えて、IL-1およびIL-6、他の分裂促進因子は、以下を含む血管壁に浸潤する細胞によって生成される：TGF $\beta$ 、FGF、トロンボスポンジン、セロトニン、トロンボキサンA<sub>2</sub>、ノルエピネフリン、およびアンジオテンシンII。これは、より多くの細胞の補充、さらなる細胞外マトリクスの生成、およびさらなる脂質の蓄積を生じる。これは、アテローム性動脈硬化症の病巣が脈管管腔に有意に侵食するまで、その病巣を進行的に大きくする。初期に、脈管を通る閉塞した血流は、増加した流れが必要とされる場合にのみアテローム性動脈硬化症プラークに遠位の組織の虚血を引き起こし、その後、病巣がさらに動脈をブロックするにつれ、虚血は安静な状態にて生じる。

拡大しているアテローム性動脈硬化症プラーク中のマクロファージは、隣接する組織の細胞損傷および壊死を引き起こす酸化脂質、フリーラジカル、エラスターゼ、およびコラーゲナーゼを放出する。病巣は壊死性コアを発生させ、そして複合体プラークに形質転換される。複合体プラークは、以下を引き起こすの止め得る不安定な病巣である：塞栓形成；局所的出血（病巣の急速な拡大に起因する管腔閉塞を生じるプラークを提供する、脈管の脈管の破裂について二次的）；または潰瘍形成および裂形成（これは、トロンボゲン形成壊死性コアを血流に曝露し、局所的血栓症または遠位の塞栓形成を生じる）。上記の続発症のどれも生じない場合でさえ、接着性血栓は、組織化され、そしてプラークに取り込まれるようになり、それによってその増殖を加速し得る。さらに、フィブリンノーゲンおよびトロンビンの局所濃度が増大するにつれ、中膜および内膜内の脈管平滑筋細胞の増殖が刺激され：このプロセスはまた、血管のさらなる狭小化を究極的に導く。

正常な動脈の内膜および中膜は、酸素化され、そして動脈の管腔から、または外膜内の脈管の脈管からの栄養分を補充される。アテローム性動脈硬化症プラーク

クの発達につれ、外膜の脈管の脈管から生じる微小脈管は、厚くなった内膜および中膜に拡張する。プラークが悪化し、そしてプラーク退行を減少するにつれ、この脈管網はより広範になる。

これらの微小脈管からの出血は、動脈解離、潰瘍形成、または血栓症と関連するプラークの突然の拡張および破裂を引き起こし得る。これらの微小脈管からの血漿タンパク質の漏出が領域への炎症性浸潤を誘導し得、そしてこれらの炎症細胞が、アテローム性動脈硬化症プラークの急速な増殖、および関連する合併症（局所的水腫および炎症を介する）に寄与し得ることもまた、仮定されている。

先に議論したような脈管性疾患を処置するために、抗微小管剤（キャリアを含むか、または含まないかのいずれか）は、身体の通路の外側の部分、または身体の通路の外膜を介して平滑筋に送達され得る。この点において特に好ましい抗微小管剤は、例えばタキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル（doce taxel））、カンフォテシン（camptothecin）、エルーテロビン（eleutherobin）、サルコジタチン（sarcodictyins）、エポシロン（epothilones）AおよびB、ジスコデルモリド、重水（D<sub>2</sub>O）、ヘキシレングリコール（2-メチル-2,4-ペンタンジオール）、ツベルシジン（7-デアザアデノシン）、LY290181（2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルボニトリル）、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスタシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質（タキソール様タンパク質、TALP）、低張性（190mosmol/L）条件により誘発される細胞膨張、インスリン（100nmol/L）またはグルタミン（10mmol/L）、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01（キネシン様タンパク質）、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素（例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン（extensin））、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質（例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン（ensconsin）、延長因子-1- $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）およびE-MAP-115）、細胞独立体（entities）（例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体）、内因性微小管構造（例えば、軸糸構造、プラグ、およびGTPキャップ）

、ポリペプチドのみの安定な管（例えば、STOP145およびSTOP220）、および有糸分裂力からの張力、ならびに上記のいずれかの任意のアナログおよび誘導体を含む。

特定の実施態様において、抗微小管剤は、パクリタキセル、カンフォテシン、またはエポシロン以外の薬剤である。このような薬剤は、特定の実施態様において、ポリマー製キャリアとの組成物として、または上記および下記でより詳細に議論したようなリポソーム処方物で送達され得る。本発明の好ましい実施態様において、薬剤または組成物は、バルーンカテーテルによって、経口的に、脈管周囲的に、ステントによって、全身に投与され得る。

本発明の他の局面において、本明細書中に記載される抗微小管治療剤または組成物は、新生物性閉塞を処置するために利用され得る。手短には、本明細書中で利用されるように、「新生物性閉塞」は、管の位置または存在する悪性腫瘍の組織学的型にかかわらず、身体的な管の任意の新生物性（良性または悪性）閉塞を含むことが理解されるべきである。代表的な例は、胃腸疾患（例えば、口咽頭ガン、腺ガン、食道ガン（扁平上皮細胞、腺ガン、リンパ腫、黒色腫）、胃ガン（腺ガン、形成性胃組織炎、リンパ腫、平滑筋肉腫）、小腸腫瘍（腺腫、平滑筋腫、脂肪腫、腺ガン、リンパ腫、カルチノイド）、結腸ガン（腺ガン）、および肛門直腸ガン）；胆管疾患（例えば、膵臓ガン（腺管ガン、島細胞腫瘍、嚢胞腺ガン）、胆管ガン、および肝細胞ガンのような胆管閉塞を生じる新生物）；肺疾患（例えば、肺および／または気管／気管支通路のガン（小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン））；女性生殖疾患（例えば、ファローピウス管の悪性腫瘍、子宮ガン、頸ガン、膣ガン）；男性生殖疾患（例えば、精巣ガン、精巣上体のガン、精管の腫瘍、前立腺ガン、良性前立腺肥大）；および尿路疾患（例えば、腎細胞ガン、腎盂の腫瘍、移行細胞ガン、膀胱ガンのような尿収集系の腫瘍、および良性の狭窄または悪性腫瘍に起因する尿道閉塞）を含む。

例として、良性前立腺肥大(BPH)は、前立腺、特に尿道を囲む腺の中央部分の、延長したアンドロゲン性刺激に応答して生じる拡大である。それは、50歳を超える男性の80%より多くに影響を及ぼす。この拡大は、前立腺を通る尿道の部分

の圧縮を生じ得、膀胱流出路の閉塞を生じる、すなわち異常に高い膀胱圧が、尿の流れを生じるのに必要とされる。1980年、米国において、BPHのための処置として367,000件の前立腺の経尿道的切除が実施された。他の処置は、投薬、経尿道的括約筋切開、経尿道的レーザーまたはマイクロ波、経尿道的高熱、経尿道的超

音波、経直腸的マイクロ波、経直腸的高熱、経直腸的超音波、および外科的切除を含む。すべては、失禁および狭窄形成を生じる括約筋機構の妨害を含む不利点を有する。

先に議論したような新生物疾患を処置するために、広範な種々の治療剤（重合体キャリアを含むか、または含まないのいずれか）は、身体通路の外側の部分、または身体通路の外膜を介して平滑筋細胞に送達され得る。例えば、1つの好ましい実施態様において、針またはカテーテルは、超音波ガイダンス下で経直腸的経路（あるいは経会陰的）を介して、尿道に隣接する前立腺に導き、これを通して、特に尿道の周りの、特に腺のいくつかの象限(quadrant)に治療剤を送達する。針またはカテーテルはまた、直接的な触診下、または内視鏡、蛍光透視鏡、CT、またはMRIガイダンス下で置かれ得、そして間隔をおいて投与され得る。代替として、カテーテルまたはトロカールを介するペレットの設置もまた、達成され得る。上記の手順は、単独または前立腺尿道に設置されるステントと組み合わせで達成され得る。尿道器具または尿道に対する損傷を回避することによって、括約筋機構は、完全なままであり、失禁を回避し、そして狭窄の可能性はより低くなる。

本発明の他の局面において、身体通路の閉塞に影響を及ぼすか、またはそれを引き起こす炎症性疾患を予防または処置するための方法が提供される。炎症疾患は、種々の身体の管の閉塞を生じる、急性および慢性の両方の炎症を含む。代表的な例は、脈管炎（例えば、巨細胞動脈炎（側頭動脈炎、高安動脈炎）、多発性動脈炎、アレルギー性血管炎、および肉芽腫症（チャーグーストラウス病）、多発性血管炎オーバーラップ(overlap)症候群、過敏性血管炎（ヘーノホーシェーライン紫斑病）、血清病、薬物誘導脈管炎、感染性脈管炎、新生物性脈管炎、結



合組織障害に関連する脈管炎、補体系の先天性欠損に関連する脈管炎)、ヴェーゲナー肉芽腫症、川崎病、中枢神経系の脈管炎、バーガー病、および全身性硬化症); 胃腸管疾患(例えば、膵炎、クローン病、潰瘍性結腸炎、潰瘍性直腸炎、原発性硬化症胆管炎、特発性を含む任意の原因の良性狭窄(例えば、胆管、食道、十二指腸、小腸、または結腸の狭窄)); 気道疾患(例えば、喘息、過敏性肺炎、石綿症、珪肺症、およびじん肺の他の形態)、慢性気管支炎、および慢性閉塞性

気道疾患); 鼻涙管疾患(例えば、特発性を含むすべての原因の狭窄); ならびにエウスターキオ管疾患(例えば、特発性を含むすべての原因の狭窄)を含む。

先に議論したような炎症性疾患を処置するために、抗微小管剤(キャリアを含むか、または含まないかのいずれか)は、身体の通路の外側の部分、または身体の通路の外膜を介して平滑筋に送達され得る。

本発明のなお別の局面において、身体通路の閉塞と関連するか、またはその原因となる感染性疾患を処置または予防するための方法を提供する。手短には、感染性疾患は、いくつかの急性および慢性感染性プロセスを含み、以下を含む身体通路の閉塞を生じ得る: 例えば、男性生殖路の閉塞(例えば、尿道炎、精巣上体炎、前立腺炎に起因する狭窄); 女性生殖路の閉塞(例えば、膣炎、子宮頸炎、骨盤炎症性疾患(例えば、結核、淋菌、クラミジア属、腸球菌、および梅毒)); 尿路閉塞(例えば、膀胱炎、尿道炎); 気道閉塞(例えば、慢性気管支炎、結核、他のマイコバクテリア感染(MAIなど)、嫌気性感染、真菌性感染、および寄生虫感染); および心臓血管閉塞(例えば、真菌性動脈瘤および感染性心内膜炎)を含む。

先に議論したような感染性疾患を処置するために、広範な種々の治療剤(キャリアを含むか、または含まないかのいずれか)は、身体の通路の外側の部分、または身体の通路の外膜を介して平滑筋に送達され得る。この点において特に好ましい治療剤は、先に議論したような抗微小管剤を含む。

#### 10. 移植片拒絶

上記の抗微小管剤および組成物は、移植片拒絶を処置または予防するために利

用され得るようである。手短には、慢性移植片／器官拒絶の2つの主要な組織学的徴候は、炎症およびアテローム性動脈硬化症である。この最内膜(neointimal)過形成は、長く生存している腎臓同種移植片(Humeら、J. Clin. Invest. 34:327, 1955; Buschら、Human Pathol. 2:253, 1971)、ならびに心臓同種移植片(Johnsonら、J. Heart Transplantation 8:349, 1989)、肝臓同種移植片(Demetrisら、Am. J. Pathol 118:151, 1985)、ならびに肺移植片(Burkeら、Lancet I:517:1986)において観察されている。心臓移植片は、冠状血流への心筋の依

存のために、この管腔の狭小化に非常に感受性である。

多くの動物モデルを用いて、慢性の心臓同種異系拒絶が研究されている。Lewis-F344ラット心臓移植モデルは、動脈硬化性の病変形成により特徴付けられる慢性拒絶をともなう心臓同種異系拒絶を生成する。このモデルは、レシピエントの80%以上が3週間以上生存し、これらの90%が冠状動脈内膜病変をともなうので有用である(Adamsら、Transplantation 53:1115-1119, 1992)。病変の高い発生数および重篤度を示すことに加えて、病変進行の炎症段階は、この系が免疫抑制を必要としないので、極めて認識が容易である。単核の浸潤および壊死の程度は、より重篤であるが、このモデルにおける動脈病変は、臨床移植片の動脈硬化に強く類似している。

移植片拒絶に対する有効な抗微小管治療は、以下の少なくとも1つを達成する：(i)移植片の寿命を延長し、(ii)免疫抑制治療にともなう副作用を低減し、および(iii)移植にともなう促進された動脈硬化症を低減する。

移植片拒絶を処置するための適切な抗微小管剤は、例えば、タギサン類(例えば、パタリタキセルおよびドセタキセル)、カンプトテシン、エポシロンAおよびB、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、ツベルシジン(7-デアザアデノシン)、LY290181(2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルドニトリル)、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質(タキソール様タンパク質、TALP)、低張(190mosmol/L)条件により誘導さ

れる細胞腫張、インスリン(100nmol/L)またはグルタミン(10mmol/L)、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01(キネシン様タンパク質)、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素(例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン)、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質(例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン、延長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )およびE-MAP-115)、細胞体(例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体)、内因性微小管構造(例えば、軸糸構造、プラグおよびGTPキャップ)、安定な細管のみのポリペプチド(例えば、STOP145およびSTOP220)お

よび有糸分裂力からの張力、ならびに上記いずれかの任意のアナログおよび誘導体を含む。このような薬剤は、特定の実施態様で、上記および下記の両方でより詳細に論議されるように、ポリマー性キャリアとともに、またはリポソーム処方物中の組成物として送達され得る。

抗微小管剤は、上記の終点を達成するために、任意の方法で移植物とともに投与され得る。しかし、好ましい方法には、経口投与または静脈内、皮下、または筋肉内注射を含む。抗微小管剤は、慢性の移植片拒絶を防ぐために長期の低用量治療として、または急性の移植片拒絶を防ぐためにより高い用量で投与され得る。例えば、パクリタキセルについては、全身的な長期低用量治療は、治療応答に依存して1～4週毎に10～50mg/m<sup>2</sup>で投与され得；高用量「パルス」治療は、1～21日毎に50～250mg/m<sup>2</sup>で投与され得、必要に応じて6回まで繰り返される。他の抗微小管剤は、薬剤の効力および許容力に調節された相当する用量で投与され得る。

#### 11. 全身性エリテマトーデス

全身性エリテマトーデス(SLE)は、核、細胞質および細胞膜抗原と反応性の抗体の産生と関連した、多くの異なる器官系における炎症により特徴付けられる未知の原因の疾患である。SLEは、いくつかの集団において2500人に1人にあり得るという高い有病率で、かなり一般的な疾患である(Michetら、Mayo Clin. Proc. 60:105、1985)。SLEは、10～64才の間の年齢の女性の間で700人に1人の頻度で、女性対男性の比が9：1である女性に優勢な疾患である。SLEの全体で毎年

の発生数は、集団のリスクに依存して、毎年、100,000の集団あたり約6～35の新たな事例がある。

SLEは、種々の種類の自己抗体の分泌を生じるヘルパー T細胞およびB細胞の活性化を起こすのと同時に作用する、遺伝的、ホルモンのおよび環境因子の間の相互作用から生じる複数因子起源の複雑な疾患であるようである。しばしば、SLEは、自己免疫疾患として分類され、特に核抗原(抗核抗体-ANA)およびリン脂質に対して惹起された、増加した数の自己抗体により特徴付けられる。抗リン脂質抗体は、狼瘡患者の20～40%に存在し、そして多数のアニオン性リン脂質と反応

することが見出されている。

SLEにおける形態学的変化は、極度に可変性であり、個々の患者における疾患の臨床的徴候および経過の多様性を反映する。最も特徴的な病変は、免疫複合体の沈着から生じ、そして血管、腎臓、結合組織および皮膚において見出される。小動脈および細動脈を含む急性の壊死性の血管炎は、皮膚および筋肉が最も一般的に影響されるが、任意の組織に存在し得る。小血管の血管炎により影響された器官では、通常、最初の病変は、顆粒球浸潤および細血管周囲の浮腫により特徴付けられる。血管壁におけるフィブリノイド沈着もまた、動脈炎を特徴付ける。慢性期には、血管は、管腔が狭くなる線維性の厚膜化を受ける。脾臓では、これらの血管病変は、中央動脈を含み、そしていわゆるオニオンスキン(onion skin)病変を生成する顕著な血管周囲の線維症によって特徴付けられる。

SLEを処置するための適切な抗微小管剤は、例えば、タキサン類(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)、カンプトテシン、エポシロンAおよびB、ジスコデルモリド、重水(D<sub>2</sub>O)、ヘキシレングリコール(2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、ツベルシジン(7-デアザアデノシン)、LY290181(2-アミノ-4-(3-ピリジル)-4H-ナフト(1,2-b)ピラン-3-カルドニトリル)、フッ化アルミニウム、エチレングリコールビス-(スクシンイミジルスクシネート)、グリシンエチルエステル、モノクローナル抗イディオタイプ抗体、微小管アセンブリ促進タンパク質(タキソール様タンパク質、TALP)、低張(190mosmol/L)条件により誘導される細胞腫

張、インスリン(100nmol/L)またはグルタミン(10mmol/L)、ダイニン結合、ジベレリン、XCH01(キネシン様タンパク質)、リソホスファチジン酸、リチウムイオン、植物細胞壁の構成要素(例えば、ポリ-L-リジンおよびエクステンシン)、グリセロール緩衝液、Triton X-100微小管安定化緩衝液、微小管関連タンパク質(例えば、MAP2、MAP4、tau、big tau、エンスコンシン、延長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )およびE-MAP-115)、細胞体(例えば、ヒストンH1、ミエリン塩基性タンパク質および動原体)、内因性微小管構造(例えば、軸糸構造、プラグおよびGTPキャップ)、安定な細管のみのポリペプチド(例えば、STOP145およびSTOP220)および有糸分裂力からの張力、ならびに上記いずれかの任意のアナログおよび誘導体を含む。このような薬剤は、特定の実施態様で、上記および下記の両方でより詳細に論議さ

れるように、ポリマー性キャリアとともに、またはリポソーム処方物中に組成物として送達され得る。本発明の好ましい実施態様では、これらの薬剤または組成物は、吸入により、鼻腔内に、全身に、または局所的に(例えば、鼻ポリープの場合)投与され得る。

#### 処方および投与

上記のように、本発明の抗微小管剤は、種々の形態(例えば、ミクロスフェア、ペースト、フィルム、スプレー、軟膏、クリーム、ゲルなど)で処方され得る。さらに、本発明の組成物は、1より多い抗微小管剤を含み、種々のさらなる化合物を含み、特定の物理的特性(例えば、弾力性、特定の融点、または特定された放出速度)を有するように処方され得る。本発明の特定の実施態様では、組成物は、所望の効果を達成するために組み合わせられ得る(例えば、ミクロスフェアの種々の調製物は、1つ以上の抗微小管剤の急速かつ緩慢の両方または延長した放出を達成するために組み合わせられ得る)。

抗微小管剤は、単独、あるいは薬学的または生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤と組み合わせてのいずれかで投与され得る。一般に、このようなキャリアは、採用される用量および濃度では、レシピエントに非毒性であるべきである。通常、このような組成物の調製は、治療的薬剤を、緩衝液、アスコルビン酸のような抗酸化剤、低分子量(約10の残基より少ない)ポリペプチド、タ

ンパク質、アミノ酸、グルコース、スクロースまたはデキストリンを含む炭水化物、EDTAのようなキレート剤、グルタチオンおよびその他の安定剤、ならびに賦形剤と組み合わせを伴う。中性の緩衝化生理食塩水または非特異的血清アルブミンと混合した生理食塩水は、模範的な適切な希釈剤である。

上記のように、本明細書中に提供される、抗微小管剤、組成物、または薬学的組成物は、例えば、炎症の部位へ局所的に、経口的に、直腸から、頭蓋内に、硬膜下腔内に、鼻腔内に、眼内に、静脈内に、皮下に、腹膜内に、筋肉内に、舌下または膀胱内、を含む、種々の異なる経路による投与のために調製され得る。投与のその他の代表的な経路には、(好ましくは、超音波、CT、蛍光透視法、MRIまたは内視鏡の案内による)疾患部位への直接投与を含む。

本明細書中に提供される治療剤、治療組成物、および薬学的組成物は、このような材料の使用に関する使用説明書を提供するパッケージ材料とともに、容器内に配置され得る。一般に、このような使用説明書は、試薬濃度、ならびに特定の実施態様では、抗微小管剤、抗微小管組成物、または薬学的組成物を再構成するために必要であり得る、賦形剤成分または希釈剤(例えば、水、生理食塩水、またはPBS)の相対量を記載する具体的な表現を含む。

以下の実施例は、例示のために提供されるが、限定のために提供されない。

#### 実施例

上記のように、慢性炎症は、白血球細胞(マクロファージ、リンパ球、好中球、および形質細胞)をとともなう組織浸潤、炎症細胞および細胞産物(活性酸素種、マトリクスメタロプロテイナーゼのような組織分解酵素)による組織破壊、および結合組織補充による修復の反復的な試み(血管形成および線維症)により特徴付けられるプロセスである。

抗微小管剤の、慢性的な炎症に影響するそれらの能力を評価するためには以下の病理学的/生物学的終点：(1)炎症カスケードを開始する白血球細胞応答(マクロファージ、好中球およびT細胞)の阻害；(2)線維症の進行および器官機能の損失に至る間葉細胞(線維芽細胞、滑膜細胞など)過剰増殖の阻害；(3)組織病変を引き起こすマトリクスメタロプロテイナーゼ産生/活性の阻害；(4)炎症応答を増

大し、そして線維組織の増殖および発達に必要な代謝的支持を提供し得る新血管形成の破壊；および(5)このすべて、は、正常実質細胞に対する実質的な毒性なくしてか、またはマトリックス成分(例えば、コラーゲンおよびプロテオグリカン)の正常な合成を損なうことなく達成されなければならない。

以下により詳細に示されるように、微小管を安定化する薬剤、例えば、パクリタキセルの活性が、種々の組織および炎症疾患状態で検査されている。これらの薬剤は、上記の疾患パラメーターの多くを改変する能力を示す。

### 実施例 1

#### 好中球活性に対する抗微小管剤の影響

この実施例は、オプソニン化CPPD結晶またはオプソニン化ザイモザンで刺激された好中球の応答に対する抗微小管剤の影響を記載する。以下に提示される実験により示されるように、抗微小管剤は、化学発光、スーパーオキシドアニオン産生、および血漿オプソニン化微結晶またはザイモザンに応答する脱顆粒により測定したとき、粒子で誘導される好中球活性化の強力なインヒビターである。

#### A. 材料および方法

ハンクスの緩衝化生理食塩水溶液(HBSS)pH7.4をこの研究の間を通じて用いた。全ての化学薬品は、他の記載がなければ、Sigma Chemical Co(St. Louis, MO)から購入した。すべての実験は、他の記載がなければ37℃で行った。

##### 1. 結晶の調製および特徴付け

CPPD(三斜晶系)結晶を調製した。この結晶のサイズ分布は、10  $\mu$ m未満が約33%、10~20  $\mu$ mの間が58%、そして20  $\mu$ mを超えるものが9%であった。上記の条件下で調製された結晶は、発熱物質を含まず、そして滅菌、発熱物質を含まない条件下で生成された結晶は、通常、無菌でない実験室条件下で調製された結晶と同じ程度の好中球応答を生じた。

##### 2. 結晶およびザイモザンのオプソニン化

パクリタキセルの存在下で結晶またはザイモザンに対する好中球応答を調べたすべての実験は、血漿オプソニン化CPPDまたはザイモザンを用いて実施された。結晶またはザイモザンのオプソニン化は、50%血漿の1 mlあたり75mgのCPPDまた

は12mgのザイモザンの濃度で50%のヘパリン処理血漿を用いて行った。結晶またはザイモザンは、血漿と37℃で30分間インキュベートし、次いで過剰のHBSS中で洗浄した。

### 3. 好中球調製

好中球は、新たに採取されたヒトのクエン酸塩化の全血から調製された。簡単に述べれば、400mlの血液を、HBSS中の4%デキストランT500(Pharmacia LKB, Biotechnology AB Uppsala, Sweden)80mlと混合し、そして1時間沈降させた。血漿を連続的に集め、そして5mlを、15mlポリプロピレンチューブ(Coming, NY)中の5ml Ficoll Paque(Pharmacia)に添加した。500gで30分間の遠心分離の後、好中球ペレットを、20秒間の低張ショックにより赤血球を含まないように洗浄した。好中球をHBSS中に再懸濁し、氷上に保持し、そして3時間以内に実験に用いた。好中球生存率および純度は、常に90%以上であった。

### 4. 好中球の抗微小管剤とのインキュベーション

#### (a) パクリタキセル

ジメチルスルホキシド(DMSO)中の12mMのパクリタキセルのストック溶液を、各実験前に新たに調製した。このストック溶液を、DMSO中に希釈し、1~10mMの濃度範囲でパクリタキセル溶液を得た。これら希釈パクリタキセル溶液の等容量を、穏和なボルテックスで、5,000,000細胞/mlの好中球に添加し、0.5%の最終DMSO濃度で0~50  $\mu$ Mの濃度を達成した。結晶またはザイモザンの添加前に、細胞を、33℃で20分間、次いで37℃で10分間インキュベートした。

#### (b) フッ化アルミニウム

HBSS中1Mのフッ化アルミニウム( $\text{AlF}_3$ )のストック溶液を新たに調製した。このストック溶液をHBSS中で希釈し、5~100mMの濃度範囲の $\text{AlF}_3$ 溶液を得た。これら希釈 $\text{AlF}_3$ 溶液の等容量(50  $\mu$ l)を、5,000,000細胞/mlの好中球に添加し、そして37℃で15分間インキュベートした。ルミノール(1  $\mu$ M)を添加し、次いで20  $\mu$ lのオプソニン化ザイモザン(最終濃度=1 mg/ml)を添加し、細胞を活性化した。

#### (c) グリシンエチルエステル



HBSS中の100mMのグリシンエチルエステルのストック溶液を新たに調製した。このストック溶液をHBSS中で希釈し、0.5~10mMの濃度範囲のグリシンエチルエステル溶液を得た。これら希釈グリシンエチルエステル溶液の等容量(50  $\mu$ l)を、5,000,000細胞/mlの好中球に添加し、そして37℃で15分間インキュベートした。ルミノール(1  $\mu$ M)を添加し、次いで20  $\mu$ lのオプソニン化ザイモザン(最終濃度 = 1 mg/ml)を添加し、細胞を活性化した。

(d) LY290181

HBSS中の100  $\mu$ MのLY290181のストック溶液を新たに調製した。このストック溶液をHBSS中で希釈し、0.5~50  $\mu$ Mの濃度範囲のLY290181溶液を得た。これら希釈LY290181溶液の等容量(50  $\mu$ l)を、5,000,000細胞/mlの好中球に添加し、そして37℃で15分間インキュベートした。ルミノール(1  $\mu$ M)を添加し、次いで20  $\mu$ lのオプソニン化ザイモザン(最終濃度 = 1 mg/ml)を添加し、細胞を活性化した。

5. 化学発光アッセイ

すべての化学発光研究は、CPPD(50mg/ml)を用い、HBSS中、5,000,000細胞/mlの細胞濃度で実施した。すべての実験において、0.5mlの細胞を、1.5mlのキャップ付きEppendorfチューブ中の25mgのCPPDまたは0.5mgのザイモザンに添加した。HBSS中の25%DMSOに溶解したルミノールの10  $\mu$ lを、1  $\mu$ Mの最終濃度になるように添加し、そしてサンプルを混合して結晶またはザイモザンによる好中球活性化を開始した。化学発光は、LKB Luminometer(Model 1250)を用い、結晶またはザイモザンを再懸濁するために、測定直前に振とうして37℃で20分間モニターした。コントロールのチューブには、細胞、薬物およびルミノールを含めた(結晶なし)。

6. スーパーオキシドアニオン生成

スーパーオキシドアニオン濃度は、チトクロムCアッセイのスーパーオキシドジスムターゼ阻害可能な還元を用いて測定した。簡単に述べれば、25mgの結晶または0.5mgのザイモザンを、1.5mlのキャップ付きEppendorfチューブに入れ、そして37℃まで加温した。37℃で0.5mlの細胞を、フェリチトクロムCとともに添加(最終濃度1.2mg/ml)し、そしてキャップを閉めたチューブを振とうすることに

より細胞を活性化した。適切な時間に、チューブを、10,000gで10秒間遠心分離し、そして550nmの吸光度が測定されるアッセイ用に上清液を集めた。コントロールチューブは、600単位/mlでスーパーオキシドジスムターゼを含めた同一条件下でセットアップした。

#### 7. 好中球脱顆粒アッセイ

25mgのCPPDまたは1mgのザイモザンのいずれかを含む1.5mlのEppendorfチューブを、37℃まで予備加熱した。37℃で、0.5mlの細胞を添加した後、激しく振とうし反応を開始した。適切な時間に、チューブを、10,000gで10秒間遠心分離し、そして0.4mlの上清を後のアッセイのために-20℃で貯蔵した。

リゾチームは、*Micrococcus lysodeikticus*懸濁液の450nmの吸光度における減少により測定した。簡単に述べれば、*Micrococcus lysodeikticus*を、0.1mg/mlで、65mMのリン酸カリウム緩衝液pH6.2に懸濁し、そして450nmにおける吸光度を、希釈により0.7単位に調節した。結晶(またはザイモザン)および細胞上清液(100μl)を、2.5mlの*Micrococcus*懸濁液に添加し、そして吸光度における減少をモニターした。0~2000単位/mlの範囲にあるリゾチーム標準(ニワトリ卵白)を調製し、そして450nmの吸光度における減少速度に対するリゾチーム濃度の更正グラフを得た。

ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性は、ジアニシジンの酸化をともなう450nmの吸光度の増加により測定した。7.8mgのジアニシジンを、音波処理により、3.2mMで、pH5.5の0.1Mクエン酸緩衝液100ml中に溶解した。1mlのギュベットに、0.89mlのジアニシジン溶液を添加し、次いで1%Triton x 100を50μl、水溶液中の0.05%過酸化水素の10μl、および結晶-細胞上清液の50μlを添加した。MPO活性は、以下の等式を用いて、吸光度(450nm)/分の変化、 $\Delta A_{450}$ から測定した：

$$\text{ジアニシジン酸化(nmol/分)} = 50 \times \Delta A_{450}$$

#### 8. 好中球生存率

好中球生存率に対する抗微小管剤の影響を測定するために、細胞質マーカー酵素である乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の放出を測定した。脱顆粒実験からの薬物(結晶なし)をともなう細胞を含むコントロールチューブもまた、LDHについてアッ

セイした。

## B. 結果

すべての実験において、統計学的有意差は、Studentのt-検定を用いて決定し

、そして有意差は $p < 0.05$ で主張した。誤差のバーが示されているところは、それらが、所定の数 $n$ に対する平均値についての1標準偏差を記載する。

### 1. 好中球生存率

#### (a) パクリタキセル

37℃で、1時間、46  $\mu$ Mのパクリタキセルで処理した好中球は、コントロールを超える増加したレベルのLDH放出をなんら示さず(常に全体の5%未満)、パクリタキセルは細胞死を引き起こさなかったことを示した。

#### (b) フッ化アルミニウム

37℃で、1時間、5~100mMの濃度範囲のフッ化アルミニウムで処理した好中球は、コントロールを超える増加したレベルのLDH放出をなんら示さず、フッ化アルミニウムは細胞死を引き起こさなかったことを示した。

#### (c) グリシンエチルエステル

37℃で、1時間、0.5~20mMの濃度範囲のグリシンエチルエステルで処理した好中球は、コントロールを超える増加したレベルのLDH放出をなんら示さず、グリシンエチルエステルは細胞死を引き起こさなかったことを示した。

### 2. 化学発光

#### (a) パタリタキセル

28  $\mu$ Mのパクリタキセルは、それぞれ図1 A、1 Bおよび図2 Aに示すように、血漿オプソニン化CPPDおよび血漿オプソニン化ザイモザンの両方の誘導性好中球化学発光の強い阻害を産生した。ピーク化学発光応答の阻害は、CPPDおよびザイモザンについて、それぞれ、52% (+/-12%) および45% (+/-11%) であった。28  $\mu$ Mのパクリタキセルによる、血漿オプソニン化CPPDおよび血漿オプソニン化ザイモザンの両方の誘導好中球化学発光の阻害は、3~16分のすべての時点で有意であった(図1 および4 A)。図1 A および1 Bは、血漿オプソニン化CPPD誘導好

中球化学発光のパクリタキセル阻害の濃度依存性を示す。すべての実験で、コントロールサンプルは、5mVを超える化学発光値を決して生成せず、そしてこの研究で用いたすべての濃度のパクリタキセルの添加は、コントロールの化学発光値に

対して影響を有していなかった。

(b) フッ化アルミニウム

5～100mM濃度のフッ化アルミニウムは、図1 Cに示すように、血漿オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光の強い阻害を産生した。この図は、血漿オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光の $AlF_3$ 阻害の濃度依存性を示す。この研究で用いたすべての濃度の $AlF_3$ の添加は、コントロールの化学発光値に対して影響を有していなかった。

(c) グリシンエチルエステル

0.5～20mM濃度のグリシンエチルエステルは、図1 Dに示すように、血漿オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光の強い阻害を産生した。この図は、血漿オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光のグリシンエチルエステル阻害の濃度依存性を示す。この研究で用いたすべての濃度のグリシンエチルエステルの添加は、コントロールの化学発光値に対して影響を有していなかった。

(d) LY290181

0.5～50  $\mu$ M濃度のLY290181は、図1 Eに示すように、血漿オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光の強い阻害を産生した。この図は、血漿オプソニン化ザイモザン誘導好中球化学発光のLY290181阻害の濃度依存性を示す。この研究で用いたすべての濃度のLY290181の添加は、コントロールの化学発光値に対して影響を有していなかった。

3. スーパーオキシド生成

チトクロムCのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)阻害可能な還元により測定したときの、血漿オプソニン化CPPD結晶誘導スーパーオキシドアニオン産生の時間経過を図3に示す。28  $\mu$ Mのパクリタキセルを用いる細胞の処理は、すべての時点において、生成するスーパーオキシド量の減少をもたらした。この減少は

、図3 Aに示されるすべての時点で有意であった。この阻害の濃度依存性は図3 Bに示される。オプソニン化ザイモザンによるスーパーオキシドアニオン産生の刺激(図4 B)は、CPPD誘導活性化に類似の時間経過を示した。28  $\mu$  Mのパクリタキセルによるザイモザン誘導スーパーオキシドアニオン産生の阻害は、CPPD活性化

の阻害に比べ劇的ではなかったが、図4 Bに示されるすべての時点で有意であった。

17  $\mu$  MのLY290181を用いたCPPD結晶誘導好中球の処置もまた、生成するスーパーオキシドの量の減少をもたらした(図3 C)。

#### 4. 好中球脱顆粒

好中球脱顆粒を、ミエロペルオキシダーゼおよびリゾチームの、血漿オプソニン化CPPD結晶誘導放出により、またはミエロペルオキシダーゼの、血漿オプソニン化ザイモザン誘導放出によりモニターした。血漿コートCPPD結晶を用いて、細胞にサイトカラシンBの添加の必要性なくして好中球を刺激するとき、これら2つの酵素の十分量が、細胞外培地中に放出されることが示された。図5 および2は、血漿コートCPPDにより刺激された好中球からの、それぞれ、MPOおよびリゾチーム放出の時間経過を示す。図5 Aは、パクリタキセルが、結晶-細胞インキュベーションの最初の9分間に、血漿オプソニン化CPPD活性化好中球からのミエロペルオキシダーゼ放出を阻害することを示す。パクリタキセルは、図5 Aで示されるように、すべての時点で、CPPD誘導ミエロペルオキシダーゼ放出を顕著に阻害した。図5 Bは、CPPD誘導ミエロペルオキシダーゼ放出のパクリタキセル阻害の濃度依存性を示す。

28  $\mu$  Mのパクリタキセルはリゾチーム放出を低減し、そしてこの脱顆粒の阻害は、図2に示されるようにすべての時点で顕著であった。

好中球が、オプソニン化ザイモザンで刺激されたとき、ほんの少量のMPOおよびリゾチームが放出された。これらの低レベルにも拘わらず、統計学的に有意であった( $p < 0.05$ ) 28  $\mu$  Mのパクリタキセルの存在下で9分間のインキュベーション後のMPO放出の50%阻害をモニターすることが可能であった(データは示さず)。1

7  $\mu$ MのLY290181を用いたCPPD結晶誘導好中球の処置は、細胞からのリゾチームおよびミエロペルオキシダーゼ放出の両方を低減した(図5Cおよび図5D)。

### C. 考察

これらの実験は、パクリタキセルおよび他の抗微小管剤が結晶誘導好中球活性化の強力なインヒビターであることを示す。さらに、粒子状アクチベータの別の形態であるオプソニン化ザイモザンに対する好中球応答における類似のレベルの阻害を示すことにより、パクリタキセルおよびその他の抗微小管剤の阻害活性が、結晶に対する好中球応答に制限されないことが明らかである。パクリタキセル、フッ化アルミニウム、グリシンエチルエステルおよびLY290181はまた、細胞死を引き起こすことなく、ザイモザン誘導好中球活性化の強力なインヒビターであることが示された。LY290181は、スーパーオキシドアニオン産生およびCPDD結晶誘導好中球の脱顆粒を低減することが示された。

### 実施例2

#### 抗原刺激に対するT細胞応答

パクリタキセルが、刺激因子(stimulagen)に応答するT細胞活性化に影響するか否かを決定するために、TR1 T細胞クローンを、ミエリン塩基性タンパク質ペプチドGP68-88またはレクチンconAのいずれかで、ミセル処方物中の増加する濃度のパクリタキセルの非存在下または存在下で48時間の間刺激した。パクリタキセルは、実験の開始時か、またはペプチドまたはconAを用いて、細胞の24時間刺激後に添加した。トリチウム化チミジン取り込みを、ペプチドまたはconA刺激に応答するT細胞増殖の尺度として測定した。

結果は、T細胞刺激が、ペプチドGP68-88およびconAに応答して増加したことを示した。コントロールのポリマー性ミセルの存在下で、両方のアゴニストに応答するT細胞刺激は改変されなかった。しかし、パクリタキセルミセルを用いた処理は、実験の開始時か、または刺激後24時間目のいずれかで、濃度依存性様式でT細胞応答を低減させた。両方の条件下で、T細胞増殖は、0.02  $\mu$ Mパクリタキセルにより完全に阻害された(図79)。

これらのデータは、パクリタキセルが、抗原誘導刺激に応答するT細胞増殖の

有効なインヒビターであることを示す。

### 実施例 3

#### インビトロ滑膜細胞細胞増殖に対するパクリタキセルの影響

トリチウム化チミジン取り込み(滑膜細胞DNA合成の測定)およびインビトロ細胞増殖に対する異なる濃度のパクリタキセルの影響を評価するために、2つの実験を行った。

#### A. 材料および方法

##### 1. 滑膜細胞中への $^3\text{H}$ チミジン取り込み

滑膜細胞を、異なる濃度のパクリタキセル( $10^{-5}\text{ M}$ 、 $10^{-6}\text{ M}$ 、 $10^{-7}\text{ M}$ 、および $10^{-8}\text{ M}$ )とともに、6または24時間の間連続的にインビトロでインキュベートした。これらの時点で、 $1 \times 10^{-6}\text{ cpm}$ の $^3\text{H}$ チミジンを細胞培養に添加し、そして $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。細胞を、細胞回収器を通して配置し、フィルターを通じて洗浄し、フィルターを切断し、そしてフィルターセクション中に含まれる照射量を測定した。一旦細胞中に取り込まれたチミジンの量が確かめられると、それは、細胞増殖速度を決定するために用いられた。この実験は3回繰り返し、そしてデータを照らし合わせた。

##### 2. 滑膜細胞増殖

ウシ滑膜線維芽細胞を、異なる濃度のパクリタキセル( $10^{-5}\text{ M}$ 、 $10^{-6}\text{ M}$ 、 $10^{-7}\text{ M}$ 、および $10^{-8}\text{ M}$ )の存在下または非存在下で24時間の間増殖させた。この時点の終わりに、生存滑膜細胞細胞の総数を、トリパンブルー染色を用いて色素排除計数により肉眼で測定した。この実験は、4回繰り返し、そしてデータを照らし合わせた。

#### B. 結果

##### 1. 滑膜細胞中への $^3\text{H}$ チミジン取り込み

この研究は、低濃度のパクリタキセルが、 $10^{-8}\text{ M}$ と同程度の低濃度で、滑膜細胞における $^3\text{H}$ チミジンの取り込みを(そして伸長DNA合成により)阻害することを示した。6時間で、高濃度と低濃度のパクリタキセルにより生じる阻害の程度間の有意な差違はなかった(図8)。しかし、24時間までに、より低濃度の薬物( $10^{-8}\text{ M}$ )で幾分かの効果が見られたが、なおコントロール動物中で観察されたより

実質的に低かった。

## 2. 滑膜細胞増殖

この研究は、パクリタキセルが、増殖する滑膜線維芽細胞に対して、濃度依存性様式で細胞傷害性であることを示した。 $10^{-7}$  Mと同程度の低濃度のパクリタキセルは、滑膜細胞の増殖を阻害し得る(図9)。より高濃度のパクリタキセル( $10^{-6}$  Mおよび $10^{-5}$  M)で、この薬物は、インビトロの滑膜線維芽細胞に細胞傷害性であった。

## C. 考察

上記の研究は、パクリタキセルが、滑膜由来の線維芽細胞の増殖を、インビトロで、比較的低濃度で阻害し得ることを示す。従って、慢性炎症の進行における結合組織の役割および炎症疾患の病因の間のそれらの挙動を考えれば、細胞増殖をブロックすることは、インビボの疾患の結果に好ましく影響する。

### 実施例 4

#### インビトロにおけるヒト表皮ケラチノサイトに対する パクリタキセルの活性の特徴付け

活発に増殖する正常ヒトケラチノサイトおよびHaCATケラチノサイト(自然に不死化したヒト表皮ケラチノサイト)に対するパクリタキセルの時間および用量依存性効果を調査した。

#### A. 材料および方法

ケラチノサイトに対するパクリタキセルの効果、細胞数および細胞による $^3\text{H}$ チミジン取り込みを測定することにより評価した。チミジン取り込みには、低密度でプレートしたケラチノサイト(10%FCS、グルタミン、抗生物質を補填したDMEM中)を、対数増殖期に6時間 $0 \sim 10^{-4}$  Mのパクリタキセル濃度で処理した。 $^3\text{H}$ チミジンを細胞に添加し、そしてさらに6時間インキュベートした。細胞を回収し、そして放射線活性を測定した。総細胞数を測定するために、ケラチノサイトを記載のようにプレートし、そしてパクリタキセルの存在下および非存在下で4日間



インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を集め、そしてトリパンブルー排除アッセイにより計数した。

## B. 結果

生存細胞数を、非処理コントロールのパーセントとして測定した。 $10^{-9}$  Mのパクリタキセル濃度で、細胞生存率は、非処理コントロールの100%より大きかった。その一方、 $10^{-8}$  Mにおける生存率は、87%でわずかにより少なかった(図7)。 $10^{-7}$  Mまたはより高い濃度のパクリタキセルでは、細胞生存率が有意に低下した。

## C. 考察

パクリタキセルは、 $10^{-7}$  Mと同程度の低濃度で、ヒトケラチノサイトに対して極度に細胞傷害性であった。乾癬において、ケラチノサイトは、異常に増殖する細胞であり、そしてパクリタキセルは、微小管を安定化するので、この有糸分裂が活性な系におけるその影響が期待される。その他の研究では、パクリタキセルは、増殖する滑膜細胞に対して細胞傷害性であるが、増殖しない軟骨細胞に対しては影響を持たないことが見出された。従って、パクリタキセルは、乾癬病変中の過剰増殖する細胞に対して作用し得るが、その一方、正常上皮細胞に対しては細胞傷害性はない。

### 実施例 5

#### 星状細胞増殖に対するパクリタキセルの影響

MS病変において線維状の星状細胞の数が増加し、これは、サイトカインおよびマトリクスメタロプロテイナーゼの産生を介するミエリンの破壊に関連すると考えられている(Mastronardiら、J. Neurosci. Res. 36:315-324, 1993; Chandlerら、J. Neuroimmunol. 72:155-161, 1997)。線維状の星状細胞は、線維状の星状細胞増殖の生化学的マーカーとして供される、高レベルの神経膠筋原線維酸性タンパク質(GFAP)を有する。パクリタキセルミセルの星状細胞増殖を阻害する能力は、脱髄疾患のトランスジェニックマウス中で評価された(Mastronardiら、J. Neurosci. Res. 36:315-324, 1993)。

## A. 材料および方法

連続的パクリタキセル治療の皮下投与 (2 mg/kg; 3 × /週、合計10の注射)を、疾患の臨床的発症時(約4ヶ月齢)に開始した。5匹の動物にミセル状パクリタキセルを投与し、2匹のマウスをコントロールとして用いた; 1匹のマウスは非処置通常、そして1匹が非処置のトランスジェニック同腹子であった。1匹のトランスジェニックマウスのみをコントロールとして用いた。何故なら、疾患の経過は、当実験室で良く確立されていたからである。4ヶ月齢の動物に、MSの神経学的病理の初期徴候が明らかとなった後、ミセル状パクリタキセルを注射した。

第10回目の注射の後3日目に、実験研究を終了し、そして脳組織を、組織学的分析のために処理した。光学顕微鏡観察には、組織をホルマリンで固定し、そしてパラフィン中に包埋した。切片を、抗GFAP抗体(DACO)で染色し、洗浄し、次いでHPPを結合した二次抗体と反応させた。切片を、HPPについて染色し、そしてヘマトキシリンで対比染色した。電子顕微鏡観察には、組織を、2.5%グルタルアルデヒドおよびリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.2)中で固定し、そして1%四酸化オスmiumで後固定した。切片を調製し、そしてJEOL 1200 EXIIトランスミッションEMで観察した。

## B. 結果

神経学的病状が進行するにつれ、トランスジェニックマウスの脳におけるGFAPのレベルが上昇する; これは、存在する線維状の星状細胞の数の増加を反映すると思われる。対照的に、パクリタキセルで処理されたトランスジェニックマウスは、ほぼ通常レベルのGFAPを有している(表1)。これらのデータは、パクリタキセルが、インビボ星状細胞増殖を阻害し得、それがMSにおける脱髄の防止に寄与し得ることを示唆する。

表 1 脳ホモジネート中の GFAP の定量		
群	GFAP (ng)	GFAP (ng/μg ホモジネータタンパク質)
正常マウス	0.64 ± 0.02	12.8
トランスジェニックマウス	1.80 ± 0.10	36.0
パクリタキセルで処置したトランスジェニックマウス	0.89 ± 0.05	13.6

脳組織中のGFAPのさらなる分析を、組織学的に評価した。図78は、通常マウス、

パクリタキセルで処置していないコントロールトランスジェニックマウス、およびパクリタキセルで処理したトランスジェニックマウスからの脳切片を示す。

コントロールトランスジェニックマウスは、より多い数の線維状の星状細胞を有しているが、星状細胞の形態は、通常動物で観察されるそれと類似している(細胞体から広がる厚い星状突起)。しかし、パクリタキセルで処理されたトランスジェニックマウスでは、線維状の星状細胞の数は有意に減少した。さらに、2つの形態学的変化が観察される: 線維状の星状細胞の細胞体は、丸くなるように見え(これは培養でアポトーシスに至ることが示された)、そして細胞突起は、細胞体周囲で非常に薄くなる。

電子顕微鏡を用いたさらなる微細構造分析は、トランスジェニックマウスの星状細胞が、細胞体から伸びる濃く染色された星状細胞突起により特徴付けられたことを示した。これらの幅広い突起は、生存する活発な細胞を示す、良く組織化された線維のアレイを含む。しかし、パクリタキセルで処理されたトランスジェニック動物中の星状細胞の形態は、細胞円形化、薄い線維状突起、および繊維状タンパク質の細胞内枯渇および組織崩壊により特徴付けられた(図80)。

### C. 結論

これらのデータは、パクリタキセルが、インビボで、MS病変における最も増殖性の細胞型である線維状の星状細胞の変化を引き起こすことを示す。パクリタキセルがまた、星状細胞突起の機能を阻害しており、従って、ミエリン破壊に関与する細胞事象を改変し得るようである。

## 実施例6

### 内皮細胞増殖に対するパクリタキセルの影響

パクリタキセルが、内皮細胞増殖を阻害するか否かを決定するために、EOMA細胞(内皮細胞細胞株)を低密度でプレートし、そして増加する濃度のパクリタキセルの非存在下および存在下で48時間インキュベートした。インキュベーションの後、生存細胞の数をトリパンブルー排除アッセイを用いて測定した。(図9に提供される)結果は、 $10^{-8}$  M濃度のパクリタキセルが、内皮細胞増殖を、50%以上阻害し、そして $10^{-7}$  M以上の濃度が、細胞増殖を完全に阻害したことを示す。これ

らのデータは、パクリタキセルが、内皮細胞増殖の有効なインヒビターであることを示す。すべての細胞傷害性アッセイは3回実施し、そして個々の測定を各々3回行った。

内皮細胞の周期およびアポトーシスに対するパクリタキセルの影響を測定するため、EOMA細胞を、増加する濃度のパクリタキセルの非存在下または存在下で、24時間インキュベートした。細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水中の3.7%ホルムアルデヒドで20分間固定し、DAPI(4'-6-ジアミニド-2-フェニルインドール)、 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ で染色し、そしてエピ蛍光光学下で40×対物レンズで調べた。アポトーシス細胞は、断片化した核および凝縮染色質について細胞を計数することにより評価した。データは、 $10^{-8}\text{ M}$ より大きいパクリタキセル濃度が内皮細胞アポトーシスを誘導したことを示す(図10)。

#### 実施例7

##### 増殖アッセイプロトコル(MTT)

1日目に、 $5\sim 10\times 10^4$  滑膜細胞を、ウェルあたり(96ウェルプレート)にプレートした。カラム番号1を細胞なしにした(ブランク)。2日目にプレートを軽くたたいて培地を捨て、種々の濃度の薬物を含む $200\text{ }\mu\text{l}$ の培地を添加した。細胞を、6時間、24時間または4日間曝した。カラム番号1および番号2には薬物は添加しなかった(それぞれ、ブランクおよび非処理コントロール)。薬物を含む培地を捨て、そして $200\text{ }\mu\text{l}$ の新鮮完全培地を添加した。次いで、細胞を、さらに3~4

日増殖させた。5日目に、 $20\text{ }\mu\text{l}$ のジメチルチアゾールジフェニルテトラゾリウム臭素塩(MTT)( $5\text{ mg/ml PBS}$ )を添加し、そして $37^{\circ}\text{C}$ で4時間インキュベートさせた。培地をデカントし、そして $200\text{ }\mu\text{l}$ のDMSOを添加した。プレートを30分間攪拌し、そして $562\text{ nm}$ の吸光度を読みとった。

#### 結果

データは、処理後に残る細胞数を、非処理コントロールのカラム番号2中の細胞数(細胞数は、アッセイ前になされた標準から得た)で除することにより得た、生存の%として表現した。集団の50%を殺す薬物濃度である $\text{IC}_{50}$ は、図11A~Eから内挿され得る。24時間曝した場合には、LY290181化合物が、最も有効な抗

微小管剤であり、5 nM未満のIC<sub>50</sub> で細胞増殖を低減および阻害することが見いだされた(図C)。パクリタキセル、エポチロンBおよびツベルシジンは、それぞれ、約30nM(図A)、45nM(図F)および45nM(図B)のIC<sub>50</sub> でわずかにより少なく有効であった。最終的には、フッ化アルミニウム(AlF<sub>3</sub>)およびヘキシレングリコールのIC<sub>50</sub> は、それぞれ、約32 μM(図E)および64mM(図D)の値で有意により高かった。

### 実施例 8

#### マトリクスメタロプロテイナーゼ産生に対する

#### パクリタキセルおよびその他の抗微小管剤の影響

##### A. 材料および方法

##### 1. IL-1刺激AP-1転写活性は、パクリタキセルにより阻害される

軟骨細胞を、AP-1駆動CATレポーター遺伝子を含む構築物でトランスフェクトし、そしてIL-1で刺激し、IL-1(50ng/ml)を添加し、そして種々の濃度のパクリタキセルの非存在下および存在下で24時間インキュベートした。パクリタキセル処理は、濃度依存様式でCAT活性を低減した(平均±SD)。アスタリスク(\*)で注記したデータは、IL-1誘導CAT活性と比較して、t検定に従って、P<0.05で有意性を有している。示された結果は、3つの独立した実験の代表である。

##### 2. IL-1誘導AP-1 DNA結合活性、AP-1 DNAに対するパクリタキセルの影響

結合活性を、放射線標識ヒトAP-1配列プローブおよびゲル移動度シフトアッセイを用いてアッセイした。種々の量のパクリタキセル( $10^{-7}$  から  $10^{-5}$  M)次いでIL-1β(20ng/ml)で処理しない、または処理した、軟骨細胞からの抽出物を、過剰のプローブと氷上で30分間インキュベートした後、非変性ゲル電気泳動した。「co m」レーンは、過剰の非標識AP-1オリゴヌクレオチドを含む。示された結果は、3つの独立した実験の代表である。

##### 3. IL-1誘導MMP-1およびMMP-3 mRNA発現に対するパクリタキセルの影響

細胞を、種々の濃度のパクリタキセル( $10^{-7}$  から  $10^{-5}$  M)で24時間処理した。次いで、IL-1β(20ng/ml)でさらに18時間、パクリタキセルの存在下で処理した。総RNAを単離し、そしてMMP-1 mRNAレベルを、ノーザンブロット分析により測定

した。次いでプロットを、細片とし、そしてハウスキーピング遺伝子として用いられた、<sup>32</sup>P放射線標識ラットGAPDH cDNAで再プローブした。示された結果は、4つの独立の実験の代表である。コラゲナーゼ1およびストロメリシン-発現mRNAのレベルの定量化。MMP-1およびMMP-3発現レベルは、GAPDHで標準化した。

#### 4. コラゲナーゼ発現に対するその他の抗微小管剤の影響

一次軟骨細胞培養を、ウシ軟骨から新たに単離した。細胞を、100×20mm培養デッシュ中 $2.5 \times 10^6$  /mlでプレートし、そして5%FBSを含むハムF12培地中、一晚、37℃でインキュベートした。細胞を、血清を含まない培地で一晚飢餓させ、次いで種々の濃度の抗微小管剤で6時間処理した。次いで各プレートに、IL-1(20ng/ml)を添加し、そしてプレートを、さらに18時間インキュベートした。総RNAを、酸性化グアニジンイソチオシアネート法により単離し、そして変性ゲル上の電気泳動に供した。変性したRNA試料(15 μg)を、1%変性ゲル中ゲル電気泳動により分析し、ナイロンメンブレンに移しそして<sup>32</sup>P標識コラゲナーゼcDNAプローブとハイブリダイズした。<sup>32</sup>P標識グリセルアルデヒドホスフェートデヒドロラーゼ(GAPDH)cDNAは、ほぼ等量の充填を確実にするための内部標準である。感光したフィルムをスキャンし、そしてImageQuantを用いて定量的に分析した。

### B. 結果

#### 1. マトリクスメタロプロテイナーゼのファミリーに対するプロモーター

図19Aは、ゼラチナーゼBを除くすべてのマトリクスメタロプロテイナーゼが、転写要素AP-1およびPEA-3を含んでいたことを示す。コラゲナーゼ、およびストロメリシンのようなマトリクスメタロプロテイナーゼの発現が、転写因子AP-1の活性化に依存することは良く確立されている。従って、AP-1のインヒビターは、マトリクスメタロプロテイナーゼの発現を阻害する。

#### 2. AP-1転写活性に対するパクリタキセルの影響

図19Bに示されるように、IL-1は、AP-1転写活性を5倍刺激した。パクリタキセルによる、一時的にトランスフェクトされた軟骨細胞の前処理は、IL-1誘導AP-1レポーター遺伝子CAT活性を低減した。従って、IL-1誘導AP-1活性は、軟骨細胞において、パクリタキセルにより、濃度依存様式( $10^{-7}$  から  $10^{-5}$  M)で低減され

た。これらのデータは、パクリタキセルが、軟骨細胞においてAP-1活性の有効なインヒビターであったことを示した。

### 3. AP-1 DNA結合活性に対するパクリタキセルの影響

AP-1活性のパクリタキセル阻害が、非特異的影響に起因しなかったことを確認するため、軟骨細胞核溶解物を用いて、オリゴヌクレオチドへのIL-1誘導AP-1結合に対するパクリタキセルの影響を調べた。図19Cに示されるように、IL-1誘導結合活性は、 $10^{-7}$  ~  $10^{-5}$  Mの濃度のパクリタキセルで24時間前処理された軟骨細胞からの溶解物で減少した。AP-1転写活性のパクリタキセル阻害は、DNAに対するAP-1結合における減少と緊密に相関していた。

### 4. コラゲナーゼおよびストロメリシン発現に対するパクリタキセルの影響

パクリタキセルは、AP-1活性の有効なインヒビターであったので、炎症性疾患に関与する2つの重要なマトリックスメタロプロテイナーゼであるコラゲナーゼおよびストロメリシンの、パクリタキセルまたはIL-1誘導発現の影響を調べた。簡単に述べれば、図20に示されるように、IL-1誘導は、軟骨細胞において、コラ

ゲナーゼおよびストロメリシンmRNAレベルを増大した。軟骨細胞のパクリタキセルによる24時間の前処理は、コラゲナーゼおよびストロメリシンmRNAのレベルを有意に低減した。 $10^{-5}$  Mのパクリタキセルで、完全阻害があった。この結果は、パクリタキセルが、AP-1活性を阻害する濃度に類似する濃度で、2つのマトリックスメタロプロテイナーゼの発現を完全に阻害したことを示す。

### 5. コラゲナーゼ発現に対する他の抗微小管剤の影響

図12A~Hは、抗微小管剤がコラゲナーゼ発現を阻害したことを示す。コラゲナーゼの発現は、前炎症性サイトカインであるIL-1の添加により刺激された。種々の抗微小管剤、特に、LY290181、ヘキシレングルコール、重水、グリシンエチルエステル、 $\text{AlF}_3$ 、ツベルシジン、エポシロン、およびエチレングリコールビス、(スクシンイミジルスクシネート)を用いた軟骨細胞のプレインキュベーションは、すべて $1 \times 10^{-7}$  Mと同程度の低濃度でIL-1誘導コラゲナーゼ発現を妨げる。

## C. 考証

パクリタキセルは、インビトロで $10^{-6}$  Mの濃度でコラゲナーゼおよびストロメライシンの発現を阻害し得た。この阻害は、ゼラチナーゼBを除く全てのマトリクスメタロプロテイナーゼの誘導に必要とされる工程であるAP-1活性の阻害によって説明され得るので、パクリタキセルがAP-1依存性である他のマトリクスメタロプロテイナーゼを阻害することが予想される。これらのマトリクスメタロプロテイナーゼのレベルは全ての炎症性疾患において上昇しており、そしてマトリクス分解、細胞遊走および細胞増殖、ならびに血管形成において主要な役割を果たす。従って、マトリクスメタロプロテイナーゼ(例えば、コラゲナーゼおよびストロメライシン)の発現のパクリタキセルによる阻害は、炎症性疾患に有利な効果を有する。

#### 実施例 9

##### プロテオグリカンの発現に対する抗微小管剤の効果

初代軟骨細胞培養物を、ウシの軟骨から新鮮に単離した。この細胞を、100mm×20mm培養ディッシュ中1mlあたり $2.5 \times 10^6$ でプレーティングし、そして5%FBSを含むハムF12培地中で37℃で一晩インキュベートした。この細胞は、無血清培地中で一晩飢餓させ、次いで種々の濃度( $10^{-7}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-5}$  M、および $10^{-4}$  M)の抗微小管剤で6時間処置した。次いで、IL-1(20mg/ml)を各プレートに添加し、そしてこれらのプレートをさらに18時間インキュベートした。総RNAを酸性化グアニジンイソチオシアネート法により単離し、そして変性ゲル上での電気泳動に供した。変性RNAサンプル(15 μg)を、1%の変性ゲルにおけるゲル電気泳動により分析し、ナイロンメンブレンに移し、そして $^{32}$ P-標識プロテオグリカン(アグリカン) cDNAプローブとハイブリダイズさせた。 $^{32}$ P-標識グリセルアルデヒドリン酸デヒドラーゼ(GAPDH) cDNAを、おおよそ等量の充填を確実にするための内部標準とした。曝露フィルムをスキャンし、そしてImageQuantを用いて定量分析した。

#### 結果

図13A~Hは、コラゲナーゼ発現に阻害効果を有した(実施例8)抗微小管剤(具体的には、LY290181、ヘキシレングリコール、重水、グリシンエチルエステル



、AlF<sub>3</sub>、ツベルシジンエポチロン (tubercidin epothilone)、およびエチレングリコールビスー (スクシンイミジルスクシネート) が、評価した全ての濃度で、軟骨マトリクスの主要成分であるアグリカンの発現に影響しなかったことを示す。

#### 実施例10

##### NF- $\kappa$ B活性 (細胞ベースの) アッセイ

IL-1およびTNFの両方は、NF- $\kappa$ Bと称する転写因子 (これはまた、炎症プロセスに参与する) により駆動される遺伝子の転写を活性化する前炎症サイトカインとして同定された。従って、IL-1およびTNFの炎症効果は、IL-1およびTNFの刺激に応答するレポーター遺伝子アッセイ (NF- $\kappa$ B) により間接的に評価され得る。

一日目に、NF- $\kappa$ Bレポーター構築物 (Luciferase、Promega Corp.) で安定にトランスフェクトしたNIH-3T3 (マウス線維芽細胞) を、1ウェル (24ウェルプレート) 当たり  $5 \times 10^4$  プレートした。一旦コンフルエントになると (3~4日目)、細胞を1mlの無血清培地を完全培地と置換することにより飢餓させた。24時間の飢餓の後、細胞を種々の濃度の抗微小管剤で6時間処置し、その後IL-1 (20ng/ml) およびTNF (20ng/ml) を添加した。細胞をIL-1およびTNFに1時間および16時間曝露し、そして24時間後にNF- $\kappa$ B活性を測定した。5日目に、培地を捨て、そして細胞をPBSで一回リンスした。次いで、細胞を、250  $\mu$ lの溶解緩衝液 (Promega Corp. Wisconsin) で15分間抽出した。2.5  $\mu$ lの細胞抽出物を含むチューブに25  $\mu$ lのルシフェラーゼ基質を添加することにより、NF- $\kappa$ B転写活性を、評価した。チューブをすぐにルミノメーター (Turner Designs) に挿入し、そして光放射を10秒間測定した。次いで、ルシフェラーゼのデータをタンパク質濃度について標準化した。

#### 結果

このデータを、抗微小管剤がNF- $\kappa$ B誘導において示した阻害 (誘導の倍数) を示すことにより表現した。図80A、図80B、図80C、および図80Dに示すように、ツベルシジンおよびパクリタキセルは、IL-1誘導NF- $\kappa$ B活性およびTNF誘導NF- $\kappa$ B活性の両方を阻害した。6時間処理および24時間処理についての、ツベルシジン

およびパクリタキセルの阻害効果は、それぞれ、約10  $\mu$ Mおよび2  $\mu$ Mであった。

#### 実施例11

##### パクリタキセルによる腫瘍血管形成の阻害

家畜用のニワトリ受精胚を、殻を除去する前に4日間孵化する。卵の内容物を、周りを空気で囲まれた殻を除去すること、内殻膜を分離すること、殻の反対側に穴を開けること、および平滑端から穏やかに卵の内容物を滑り出させることによって空にする。内容物を、滅菌した丸底ガラス容器へと空け、ペトリ皿の蓋で覆い、そして90%相対湿度および3%二酸化炭素で孵化する。

MDAY-D2細胞（マウスリンパ系腫瘍）をマウスに注射し、そして腫瘍を0.5~1.0gの重さになるまで増殖させる。マウスを屠殺し、腫瘍部位をアルコールで拭き、切除し、滅菌組織培養培地に置き、そして層流フード内で1mm角に刻む。切除し

た腫瘍を9日齢のニワトリ胚に入れる前に、CAM表面を30ゲージ針でおだやかに擦り、腫瘍移植を確実にする。次いで、腫瘍をインキュベーションの8日後（脱殻後4日間）にCAMに入れ、血管供給を確立するために4日間CAM上で増殖させる。4つの胚をこの方法を利用して調製し、各々の胚は3つの腫瘍を受ける。12日目に、胚の3つの腫瘍各々に、20%パクリタキセルを充填したサーモペースト（thermopaste）、充填していないサーモペースト、または処置無しのいずれかを与えた。処置を2日間継続してから結果を記録した。

外植したMDAY-D2腫瘍は、血管形成因子を分泌し、これは毛細管（CAMに由来する）の内部へ腫瘍塊への成長を誘導し、適切な大きさにまで成長を続けさせる。すべての腫瘍の血管がCAMに由来するが、全ての腫瘍細胞は移植片に由来するので、これらの2つのプロセスに対する治療的介入の効果を独立して評価することが可能である。このアッセイは、以下に対するパクリタキセルを充填したサーモペーストの有効性を決定するのに使用されている：（a）腫瘍の血管新生の阻害および（b）腫瘍細胞自身の増殖の阻害。

この研究からの固定組織の、直接インビボ実体顕微鏡による評価および組織学的検査は以下を実証した。20%パクリタキセルを充填したサーモペーストで処置

した腫瘍において、コントロール腫瘍（図14Aおよび図14B）と比較した場合、腫瘍に供給する血管の数の減少（図14Cおよび図14D）、腫瘍内の血管の数の減少、および腫瘍の周辺（代表的には固形腫瘍内に非常に高度に血管新生している領域）の血管の数の減少が存在した。腫瘍は、研究が行われた2日間の間に、大きさおよび質量が小さくなり始めた。さらに、多くの内皮細胞が細胞分裂を停止していることが見られ、これは、内皮細胞増殖が影響を受けたことを示唆する。腫瘍細胞はまた、しばしば、細胞分裂を停止していることが見られた。4つの胚全てが、20%パクリタキセルを充填したサーモペーストが腫瘍血管新生を抑制するが充填していないサーモペーストは効果が無かった点で一致するパターンを示した。

比較すると、充填していないサーモペーストで処置したCAMにおいて、腫瘍は正常な周辺組織のものと比較した場合に、血管の数および密度の増加、およびパクリタキセルを充填したペーストで処置した腫瘍において観察されるよりも劇的

に多い血管を伴って、良好に血管新生した。新たに形成された血管は、輪の中心に結合するスポークのように見える全ての角度から腫瘍に進入していた（図14Aおよび図14B）。コントロール腫瘍は、本研究の過程の間、大きさおよび質量の増加を続けた。組織学的には、多くの膨脹した薄壁毛細管が腫瘍の周囲に見られ、そして細胞分裂している内皮細胞は殆ど見られなかった。腫瘍組織は、良好に血管新生し、そしてずっと生存していた。

例として、同一のCAMに入れた2つの類似の大きさ（当初、外植時）の腫瘍において、以下のデータを得た。20%パクリタキセルを充填したサーモペーストで処置した腫瘍について、腫瘍は330mm×597mmの大きさであった；腫瘍のすぐ周辺には14の血管を有するが、腫瘍塊は、3～4の細い毛細管のみを有する。充填していないサーモペーストで処置した腫瘍について、腫瘍の大きさは623mm×678mmであった；腫瘍のすぐ周辺には54の血管をするが、腫瘍塊は、12～14の細い血管を有する。さらに、周囲のCAM自身は、パクリタキセル処置腫瘍の周辺領域と比較してはるかに多い血管を含んでいた。

本研究は、サーモペーストが腫瘍増殖および発生に伴う病理学的な血管形成を

阻害するのに十分な量のパクリタキセルを放出することを示す。これらの条件下で、血管形成は、組織周辺から腫瘍塊への毛細管の内側への伸長を誘導し得る血管形成因子を産生する腫瘍細胞によって最大限に刺激される。20%パクリタキセルを充填したサーモペーストは、このプロセスをブロックし得、そして適切な血液供給を維持する腫瘍組織の能力を制限し得る。これは、腫瘍細胞自身に対するこの薬物の細胞傷害性効果を介すること、および成長および増殖に必要とされる栄養素を組織から枯渇させることの両方による、腫瘍塊の減少をもたらす。

#### 実施例12

##### パクリタキセルによる血管形成の阻害

##### A. ニワトリ絨毛尿膜（「CAM」）アッセイ

家畜用の受精ニワトリ胚を、殻無し培養の前に3日間孵化した。この手順において、卵の内容物を周りを空気で囲まれた殻を除去することによって空にした。次いで、内殻膜を分離し、そして殻の反対端に穴を開けて卵の内容物を平滑端か

らおだやかに滑り出させた。卵の内容物を滅菌した丸底ガラス容器に空け、そしてペトリ皿蓋で覆った。次いで、これらを90%相対湿度、および3%CO<sub>2</sub>で孵化器に置き、そして3日間孵化した。

パクリタキセル (Sigma, St. Louis, MI) を、0.5%水性メチルセルロースの10  $\mu$ lアリコートあたり、0.25、0.5、1、5、10、30  $\mu$ gの濃度で混合した。パクリタキセルは水に不溶性であるので、ガラスビーズを使用して細かな粒子を生成した。この溶液の10  $\mu$ lアリコートをパラフィルム上で1時間乾燥させ、直径2 mmのディスクを形成させた。次いで、パクリタキセル含有乾燥ディスクを、孵化6日目の各CAMの成長端に慎重に置いた。コントロールは、パクリタキセルを含まないメチルセルロースディスクを同じ時間経過でCAM上に置くことによって得た。2日間の曝露後（孵化8日目）、脈管構造を実体顕微鏡の助けを用いて試験した。白色の不透明溶液であるLiposyn IIをCAMに注射して、脈管の詳細の可視性を増大させた。染色されていない、生きている胚の脈管構造を、ビデオカメラ (Dage-MTI Inc., Michigan City, IN) と接続されたZeiss実体顕微鏡を用いて画像化した。次いで、これらのビデオ信号を、160×の倍率で表示し、そして画

像分析システム (Vidas, Kontron; Etching, Germany) を用いて捕獲した。次いで、画像のネガをグラフィックレコーダー (Model 3000; Matrix Instruments, Orangeburg, NY) 上で作製した。

8日齢の殻無し胚の膜を、0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液中の2%グルタルアルデヒドに浸した。さらなる固定剤をCAMの下に注射した。10分間のインサイチュの後、CAMを除去し、そして室温で2時間新鮮な固定剤中に入れた。次いで、組織を、6%のスクロースを含むカコジル酸緩衝液中で一晩洗浄した。目的の領域を1%四酸化オスミウム中で4℃で1.5時間後固定した。次いで、組織を特級エタノール中で脱水し、溶媒をプロピレンオキシドと交換し、そしてSpurr樹脂中に包埋した。薄い切片をダイヤモンドナイフで切り、銅グリッドに置き、染色し、そしてJoel 1200EX電子顕微鏡で試験した。同様に、0.5mm切片を切り、そして光学顕微鏡のためにトルエンブルーで染色した。

発生11日目に、ニワトリ胚を、腐食鑄造技術のために使用した。Mercox樹脂 (Ted Pella, Inc., Redding, CA) を、30ゲージの皮下用針を用いてCAM脈管構

造に注射した。鑄造材料は2.5グラムのMercox CL-2Bポリマーおよび0.05グラムの触媒 (55%ベンゾイルペルオキシド) からなり、5分間の重合時間を有する。注射後、プラスチックをインサイチュに1時間室温で放置し、次いで65℃で一晩オープンに放置した。次いでCAMを、水酸化ナトリウムの50%水溶液に入れてすべての有機成分を消化した。プラスチック鑄造物を徹底的に蒸留水で洗浄し、風乾し、金/パラジウムでコーティングし、そしてPhilips 501B走査型電子顕微鏡で観察した。

上記の実験の結果を図15~18に示す。手短には、正常なニワトリの殻無し卵培養の一般特性を図15Aに示す。インキュベーションの6日目に、胚を血管の放射状に拡張する網に対して中心に配置した。CAMは胚に隣接して発生した。これらの成長する血管は表面に近接して存在し、そして容易に可視であり、そのためこの系を血管形成の研究のために理想化されたモデルとなる。CAMの、生きていて、染色されていない毛細管網は、実体顕微鏡で非侵襲性に画像化され得る。図15Bは、このような脈管化領域を示し、ここで毛細管内の細胞血液要素をビデオ／

コンピューターインターフェースの使用により記録した。このようなCAM毛細管網の三次元構造を、腐食鑄造方法によって示し、そして走査型電子顕微鏡で観察する（図15C）。これらの鑄造によって、底にある血管がCAMの表面に向かって放射し、そこで、吻合毛細管の単層を形成することが明らかになった。

CAMを横断する断面図は、二重細胞膜、外胚葉に隣接して存在する毛細管を含む、より広い中胚葉層、外膜細胞、および内部の単一内胚葉細胞層からなる外側の外胚葉を示す（図15D）。電子顕微鏡レベルで、CAM毛細管の代表的な構造の詳細を示す。代表的には、これらの血管は、外胚葉の内部の細胞層と緊密に関連する位置に存在する（図15E）。

0.25、0.5、1、5、10、または30  $\mu$ g の濃度のパクリタキセルに48時間曝露した後、各CAMを、血管形成に対する効果を評価するために、ビデオ／コンピューターインターフェースを備えた実体顕微鏡を用いて、生きている条件下で試験した。この画像化設定において、160×倍率が使用され、これによって毛細管内の血液細胞の直接の可視化が可能になり；それにより、目的の領域における血流が容易に評価され、そして記録され得た。本研究について、血液形成の阻害を、毛

細管網および血管血流を欠くCAMの領域（直径2～6 mmと測定される）と規定した。実験を通して、無血管域を4点の無血管勾配で評価した（表1）。この段階は、全体の阻害の程度を表し、そして最大の阻害を無血管勾配段階において3で表す。パクリタキセルは、非常に一致しており、そしてその濃度に依存して48時間以内に最大の無血管域（直径6 mmまたは無血管勾配段階で3）を誘導した。

表 1  
無血管勾配

0 = 正常な血管分布

1 = いくつかの微小血管の動きを欠く

2\* = 直径約 2 mm の小さな無血管域

3\* = ディスク (直径 6 mm) を超えて広がる無血管域

\* = これは、ポジティブな抗血管形成応答を示す

種々の治療剤の異なる濃度での効果の用量依存性の実験データを表 2 に示す。

表 2

薬剤	送達ビヒクル	濃度	阻害/数
バクリタキセル	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	0.25 $\mu$ g	2/11
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	0.5 $\mu$ g	6/11
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	1 $\mu$ g	6/15
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	5 $\mu$ g	20/27
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	10 $\mu$ g	16/21
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	30 $\mu$ g	31/31
	PCLペースト (3mg)	0.05%	0/9
	PCLペースト (3mg)	0.10%	1/8
	PCLペースト (3mg)	0.25%	5/7
	PCLペースト (3mg)	0.5%	4/4
	PCLペースト (3mg)	1%	8/8

薬剤

<u>送達ビヒクル</u>	<u>濃度</u>	<u>阻害／数</u>
PCLペースト (3mg)	2 %	10/10
PCLペースト (3mg)	5 %	10/10
PCLペースト (3mg)	10%	9/9
PCLペースト (3mg)	20%	6/6
20%ゼラチン：60%PCLペースト (3mg)	20%	5/6
ゼラチン (1mg)	20%	17/17
眼科用懸濁液 (2×10 $\mu$ l)	0.3%	1/12
眼科用懸濁液 (2×15 $\mu$ l)	0.3%	3/3
眼科用懸濁液 (1×15 $\mu$ l)	0.3%	15/15
眼科用ミクロスフェア	10%	4/4
懸濁液 (15 $\mu$ l)		
ステント被覆 (～1 mg)	2.5%	5/5
ステント被覆 (～1 mg)	10%	1/1
ステント被覆 (～1 mg)	33%	3/3
シクロデキストリン溶液 (10 $\mu$ l)	10%	5/5
ミセル形成乾燥物 (1 mg)	10%	毒性過剰
ミセル溶液 (10 $\mu$ l)	10%	毒性過剰
ミセル溶液 (10 $\mu$ l)	4 $\mu$ g	1/1～毒性過剰
Cremophor Taxol (10 $\mu$ l)	4 $\mu$ g	1/1～毒性過剰
4PCL：MePEGフレーク (1mg)	20%	10/13
PCL：1MePEGペースト (3mg)	20%	6/9
ミクロスフェア (粘膜接着性)	20%	7/7
ミクロスフェア (EVA)	0.6%	2/2
ミクロスフェア (30～100 $\mu$ m)	20%	11/11
遅放		
ミクロスフェア (30～100 $\mu$ m)	10%	1/8
遅放		



薬剤	送達ビヒクル	濃度	阻害/数
	ミクロスフェア (10~30 $\mu$ m)	20%	5/6
	中程度放出		
	ミクロスフェア (1~10 $\mu$ m)	10%	5/9
	中程度放出		
	ミクロスフェア (1~10 $\mu$ m)	20%	8/11
	速放		
	ミクロスフェア (EVA)	10%	9/9
	速放		
バッカチン(baccatin)	ペースト (2mg)	2 $\mu$ g	2/3
	メチルセルロース (5 $\mu$ l)	5 $\mu$ g	4/7
メトトレキサート	PCLペースト (3mg)	1%	0/13
	PCLペースト (3mg)	2%	0/3
	PCLペースト (3mg)	20%	0/1
	PCL : MePEGペースト (3mg)	2%	1/1
	95PCL : 5MePEGペースト (3mg)	1%	0/6
	95PCL : 5MePEGペースト (3mg)	10%	0/5
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	2 $\mu$ g	0/8
酢酸プレドニゾロン	眼科用懸濁液 (2 $\times$ 10 $\mu$ l)	1%	3/4
	眼科用懸濁液 (2 $\times$ 15 $\mu$ l)	1%	1/1
ピクノゲニノール (pycnogeninol)	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	10 $\mu$ g	1/18
(プロアントシアニジン)			
	PCLペースト (3ng)	15%	1/2
	PCLペースト (3mg)	30%	毒性過剰
ベロ毒素	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	10ng	0/8
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	675ng	0/2
ヘパラン硫酸	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	0.2 $\mu$ g	0/6
フラグメント (I)			
ヘパラン硫酸	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	0.4 $\mu$ g	0/7

<u>薬剤</u>	<u>送達ビヒクル</u>	<u>濃度</u>	<u>阻害/数</u>
フラグメント (2)			
パナジン酸	ミクロスフェア (1mg)	5 %	0/5
硫酸パナジル	PCLペースト (3 mg)	2.5 %	0/3
BMOV	PCLペースト (3 mg)	10 %	毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	25 %	毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	35 %	毒性過剰
BE0V	PCLペースト (3 mg)	10 %	毒性過剰
s-ホスホネート	80%PLA : 20%MePEGペースト20 % (1 mg)		毒性過剰
	PCLペースト (1 mg)	2 %	2/7
	PCLペースト (3 mg)	1 %	0/9
	PCLペースト (3 mg)	2 %	0/6
	PCLペースト (3 mg)	4 %	0/3
	PCLペースト (3 mg)	8 %	1/9
タモキシフェン	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	5 $\mu$ g	0/2
サメ軟骨粉末	N/A	1mg	0/5
エストラムスチン	PCLペースト (3 mg)	5 %	0/6
リン酸ナトリウム	PCLペースト (3 mg)	10 %	0/6
ビンブラスチン	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	9 $\mu$ g	毒性過剰
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	2 $\mu$ g	毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	0.25 %	4/6
	PCLペースト (3 mg)	0.5 %	0/4
	PCLペースト (3 mg)	1 %	2/3
	PCLペースト (3 mg)	2 %	毒性過剰
ビンクリスチン	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	9 $\mu$ g	毒性過剰
	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	1 $\mu$ g	毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	0.05 %	1/1 ~ 毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	0.1 %	2/2 ~ 毒性過剰

薬剤	送達ビヒクル	濃度	阻害/数
	PCLペースト (3 mg)	0.25%	1/1～毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	0.5%	毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	1%	毒性過剰
	PCLペースト (3 mg)	2%	毒性過剰
ジテルペン-1	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 3 $\mu$ g		0/5
ジテルペン-2	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 3 $\mu$ g		0/5
ラベンドゥスチン-c	PCLペースト (3 mg)	10%	0/14
(lavendustin-c)	PCLペースト (3 mg)	20%	0/10
MDHC (チロシン インヒビター)	PCLペースト (3 mg)	20%	0/8
エルブスタチン	PCLペースト (3 mg)	20%	0/5～毒性過剰
ゲニステイン	PCLペースト (3 mg)	10%	0/7
	PCLペースト (3 mg)	20%	0/4
ハービマイシン	PCLペースト (3 mg)	2%	3/4
	PCLペースト (3 mg)	0.5%	1/1
カンプトテシン	PCLペースト (3 mg)	0.25%	3/4
	PCLペースト (3 mg)	1%	2/3
	PCLペースト (3 mg)	5%	4/5
スラミンおよび 酢酸コルチゾン	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 20 $\mu$ g/70 $\mu$ g		2/4
	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 50 $\mu$ g/40 $\mu$ g		5/14
	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 50 $\mu$ g/50 $\mu$ g		3/26
	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 20 $\mu$ g/50 $\mu$ g		0/24
	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 70 $\mu$ g/70 $\mu$ g		0/9
スラミンおよび テトラヒドS	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 50 $\mu$ g/50 $\mu$ g		0/6
硫酸プロタミン	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 50 $\mu$ g		0/10
	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 100 $\mu$ g		1/10
TIMP	メチルセルロース (10 $\mu$ l) 15 $\mu$ g		0/5

薬剤	送達ビヒクル	濃度	阻害／数
コルヒチン	メチルセルロース (10 $\mu$ l)	3 $\mu$ g	1/1～毒性過剰

代表的なパクリタキセル処置CAMはまた、直径6mmと測定される無血管域に対して中心に位置する透明のメチルセルロースディスクとともに示す。いくらか高い倍率で、このような無血管域の周辺は明らかに明瞭である(図16C)；周辺の機能的な血管は、しばしば、パクリタキセルの供給源から再配向されていた(図16Cおよび図16D)。このような血流の曲がった再配向は、決して正常な条件下では観察されなかった。パクリタキセルの効果の別の特徴は、血液細胞凝集を示す無血管域内での血島の形成であった。

パクリタキセル処置CAMの関連する形態学的変化は、光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルの両方で容易に明らかになる。簡便な提示のために、正常から無血管状態までの一般的な転移の3つの異なる相を示す。無血管域の周辺付近では、CAMは、3つの全ての胚葉内の分裂期の細胞の豊富さによって特徴づけられる(図17Aおよび図18A)。この増強された有糸分裂はまた、毛細管内皮細胞についての観察と一致していた。しかし、内皮細胞は、血液細胞の血管外溢出を伴わないで無傷で接合部に留まっていた。さらなる分解とともに、CAMは、毛細管の崩壊および溶解によって特徴づけられる(図17Bおよび図18B)。推定上の内皮細胞は、代表的には、分裂を停止しているが、血液細胞との空間的に緊密な関係を維持し、そして外胚葉の下に存在する。しかし、これらの細胞は、接合部では連結していない。無血管域の最も中心部分は、厚くなった外胚葉層および内胚葉層によって特徴づけられる(図17Cおよび図18C)。これらの層は、厚くなっていたが、細胞接合部は、無傷のままで、そして層はそれらの構造的な特徴を維持していた。中胚葉内において、散在した分裂停止細胞が豊富であった。これらの細胞は、以前の相で観察された内皮細胞の局在化を示さなかった。また、この無血管域を通して、変性細胞は、電子が濃い液泡および細胞残渣によって示されるように通常であった(図18C)。

まとめると、本研究によって、パクリタキセルのCAMへの適用後48時間で血管形成が阻害されたことが示された。血管阻害は、パクリタキセルの効果の3つの

遷移相によって代表される無血管域を形成した。無血管域の中心の最も影響を受

けた領域は、溢出した赤血球を伴う壊れた毛細管を含んでいた。これは、内皮細胞間の細胞間接合部が存在しなかったことを示した。外胚葉および内胚葉の細胞は、それらの細胞間接合部を維持し、それによりこれらの胚葉が無傷のままであった。しかし、それらは、わずかに厚くなっていた。正常の血管域に近づくにつれ、血管は、それらの接合部複合体を保持し、それによってまた無傷のままであった。パクリタキセル処置域の周辺では、さらなる血管増殖が阻害された。これは、血管の代表的な再配向すなわち「くの字曲がり」効果によって明らかであった(図16D)。

パクリタキセル処置無血管域によってまた、CAMの3つの全ての胚葉において多くの細胞が分裂停止していることが明らかになった。これは、パクリタキセルに特有であった。なぜなら、以前の研究においてはそのような事象は示されていないからである。分裂停止することによって、内皮細胞は、血管形成に関与する、それらの正常な代謝機能を受け得ない。比較すると、スラミンおよび酢酸コルチゾンによって形成された無血管域は、CAMにおいて分裂停止細胞を産生しない。それらは、処置された領域へのさらなる血管成長を抑制しただけであった。従って、たとえ、これらの因子が抗血管形成因子であるとしても、血管形成過程が標的化されうる点は多く存在する。

パクリタキセルの48時間の期間にわたる効果もまた、観察した。この期間の観察の間に、適用後9時間後にすでに血管形成の阻害が起こっていることが認められた。組織学的な切片によって、図17Aおよび図18Aにおいて示される48時間後での無血管域の第一の遷移相に見られるのと類似の形態が明らかになった。また、本発明者らは、以前に観察された無血管域への再血管形成過程を観察した。ヘパリンおよび止血性ステロイドによって形成された無血管域が、適用後60時間後に再血管形成されたことが見出された。1つの研究において、パクリタキセル処置無血管域は、適用後少なくとも7日間再血管形成せず、これは、より長期の強力な効果を示唆した。

## LNCaP細胞増殖に対するパクリタキセルおよびカンプトテシンの効果

## 材料および方法

LNCaP細胞を、96ウェルプレートにそれぞれ、 $2 \times 10^3$  細胞/ウェルおよび  $1 \times 10^3$  細胞/ウェルの濃度で播種した。48時間後、異なる濃度のパクリタキセルまたはカンプトテシン ( $25 \mu\text{l}$ ) を各培養ウェルに添加し、そしてプレートを  $37^\circ\text{C}$  で5日間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を1%グリセルアルデヒド溶液で固定し、そして0.5%クリスタルバイオレットで5分間染色した。色素は、 $100 \mu\text{l}$ の緩衝液で連続的に溶出し、そして吸光度を、492nmの吸光度の波長を用いて、Titertek Multiskanマイクロプレート読み取り機で読み取った。細胞増殖を、化合物の非存在下でのコントロールウェル (100%に設定) に対する百分率として表現した。

## 結果

パクリタキセルは、約0.09nMの $\text{EC}_{50}$ でLNCaP細胞増殖を阻害した。アポトーシス実験をDNA断片化アッセイを用いて、パクリタキセル処置後にウェル中の細胞で実施した。細胞の広範なアポトーシスが観察された。これは、パクリタキセルがアポトーシス機構によって細胞傷害性であることを示唆する。

カンプトテシンのLNCaP細胞に対する細胞傷害性作用は、極めて強力であった。0.001nMという低い濃度でさえ、60%を超える細胞に毒性であった。従って、この薬物のLNCaP細胞に対する $\text{EC}_{50}$ は、フェムトモル濃度範囲にあるに違いない。

。

表 1

N	パクリタキセル (nM)	492nm吸光度	増殖%
16	0.001	0.049±0.05	100
16	0.01	0.40±0.03	81
8	0.05	0.36±0.02	73
8	0.1	0.20±0.03	40
8	1	0.025±0.01	5
8	10	0.027±0.01	5
8	100	0.033±0.01	6

コントロールの492nm吸光度=0.49±0.06

表 2

N	カンプトテシン (nM)	492nm吸光度	増殖%
16	0.001	0.169±0.05	36
16	0.05	0.14±0.04	29
8	0.1	0.10±0.02	21
8	1	0.10±0.02	21
8	10	0.088±0.02	17
15	100	0.038±0.01	8

コントロールの492nm吸光度=0.47±0.05

#### 実施例14

##### さらなる抗微小管剤の抗血管形成活性

パクリタキセルに加えて、他の抗微小管剤も同様に、ポリマーキャリア内に取り込まれ得る。以下に提供する代表的な例は、カンプトテシン (camptothecin) およびビンカルカロイド (例えば、ビンブラスチンおよびビンクリスチン) を

含み、そして微小管安定化剤 (例えば、ツベルシジン、フッ化アルミニウムおよびLY290181) を含む。

#### A. PCLへの薬剤の組込み

薬剤は、乳鉢および乳棒で挽いて、粒子径を5ミクロン未満に減じた。次いで、これを乾燥粉末としてポリカプロラクトン（分子量18,000、Birmingham Polymers, AL USA）と混合した。混合物を65℃に5分間加熱し、そして融解ポリマー／薬剤混合物を5分間滑らかなペーストへと攪拌した。次いで、融解ペーストを1mlシリンジへ入れ、そして押し出して3mgのペレットを形成した。次いで、これらのペレットを妊娠6日目にCAMに入れてそれらの抗血管形成特性を評価した。

#### B. CAMに対するカンプトテシンを充填したPCLペーストの効果

カンプトテシンを充填したサーモペーストは、コントロールのPCLペレットと比較した場合に血管形成を阻害するに有効であった。5%の薬物を充填して、試験した4/5のCAMが強力な血管形成阻害を示した。さらに、1%および0.25%を充填して、それぞれ、2/3および3/4のCAMが血管形成阻害を示した。それゆえ、これらの結果から、カンプトテシンがPCLサーモペーストから十分に放出され、そして治療的抗血管形成効力を有することは明白である。

#### C. ビンブラスチンを充填したPCLペーストおよびビンクリスチンを充填したPCLペーストのCAMに対する効果

処方物をCAMに対して試験する場合、薬剤が生物学的効果を誘発するに充分な量でPCLペレットから放出されたことは明白であった。ビンブラスチンおよびビンクリスチンの両方は、コントロールPCLサーモペーストペレットと比較した場合、CAMアッセイにおいて抗血管形成効果を誘導した。

0.5%および0.1%の薬物充填濃度で、ビンクリスチンは、試験したCAMの全てで血管形成阻害を誘導した。2%を超える濃度を試験した場合、有毒な薬物レベルに達し、そして予期しなかった胚の死が起こった。

ビンブラスチンはまた、0.25%、0.5%および1%の濃度でCAMに対して血管形成を阻害するに有効であった。しかし、2%を超える濃度では、ビンブラスチンは胚に対して毒性であった。

#### D. ツベルシジンを充填したPCLペーストのCAMに対する効果



ツベルシジンを充填したペーストは、コントロールペレットと比較した場合、血管形成を阻害するに有効であった。1%薬物充填で、ツベルシジンは、試験した1/3のCAMで血管形成阻害を誘導した。しかし、5%薬物充填を超える薬物濃度では、ツベルシジンは、2/3のCAMにおいて協力に血管形成を阻害した。従って、これらの結果から、ツベルシジンは、PCLペーストから十分に放出され、そして強力な抗血管形成活性を有することは明白であった。

#### E. フッ化アルミニウムを充填したPCTペーストのCAMに対する効果

フッ化アルミニウム ( $\text{AlF}_3$ ) を充填したPCLペーストは、コントロールペレットと比較した場合、20%薬物充填で血管形成を阻害するに有効であった。20%薬物充填で、2/4のCAMが、直径2~6mmと測定される無血管域によって明らかなように、血管形成阻害を示した。しかし、より低い薬物充填である1%および5%では、血管形成阻害は明白ではなかった（それぞれ、0/6のCAMおよび0/5のCAM）。従って、フッ化アルミニウムは、より高い薬物濃度でのみ血管形成阻害を誘導するに有効であった。

#### F. LY290181を充填したPCLペーストのCAMに対する効果

5%LY290181を充填したPCLペーストのCAMに対する評価によって、LY290181が試験した1/3のCAMにおいて血管形成阻害を誘発したことが示された。しかし、1%薬物充填で、LY290181は抗血管形成応答を誘発しなかった ( $n=2$ )。

### 実施例15

#### パクリタキセルの非増殖性細胞の生存度に対する効果

疾患改変剤が、慢性炎症の発症の間に過度に生じる、種々の適切でない細胞活性（増殖、炎症、タンパク質分解酵素産生）を強力に阻害し得ることは重要であ

るが、正常組織に対して毒性であってはならない。特に、正常細胞が障害を受けないことは重要である。なぜなら、これは、疾患の進行をもたらすからである。本実施例では、パクリタキセルの正常な非分裂細胞のインビトロでの生存度に対する効果を、コンフルエンスにまで増殖させた培養軟骨細胞を利用して試験した。

手短には、軟骨細胞を、パクリタキセルの存在 ( $10^{-5}$  M、 $10^{-7}$  M、および $10^{-9}$  M

）下または非存在下（コントロール）下で72時間インキュベートした。この期間の最後に、生存している細胞の総数を、トリパンブルー染色除外によって肉眼で決定した。この実験はを4回行い、そしてデータを照合した。

この実験結果を図21に示す。手短には、図21から明白なように、パクリタキセルは、高濃度 ( $10^{-5}$  M) のパクリタキセルでさえ、正常の非増殖性細胞のインビトロでの生存度には影響しなかった。より詳細には、以前の実施例において記載された病理過程を遮断するに十分な薬物濃度でさえ、正常軟骨細胞に対する細胞傷害性は存在しない。

### 実施例16

#### 局所的なパクリタキセル処方物のための透過増強剤の選択

##### A. 種々の増強剤におけるパクリタキセルの溶解性

以下の透過増強剤を試験した。Transcutol<sup>®</sup>、エタノール、プロピレングリコール、イソプロピルミリステート、オレイン酸、およびTranscutol：イソプロピルミリステート (9:1v:v)。ガラスバイアル中の1mlの各増強剤を予め37℃に加熱し、そして過度のパクリタキセルを添加した。各バイアルからの0.5mlの液体のサンプルを37℃、および13000rpmで2分間遠心分離した。遠心分離チューブからの上清のアリコート (0.1ml) を、メスフラスコに移し、そしてメタノールで希釈した。パクリタキセル含量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって評価した。

##### B. 分配係数

特定量のパクリタキセルを37℃に加熱した増強剤の一定容積に溶解した。この溶液のアリコート (1ml) を4mlのガラスバイアル中の1mlのオクタノールへ添加した。次いで、リン酸緩衝化生理食塩水 (1ml) (pH7.4) を添加し、そしてバイアルをボルテックスして、乳濁液を作製した。バイアルを37℃のオープンに16時間入れ、その後、0.1mlのオクタノール相を各バイアルから取り出し、そして9.9mlのメタノールを用いて希釈した。水相について、0.5mlをオレイン酸のバイアルおよびイソプロピルミリステートのバイアルからサンプリングし、そして0.5mlをプロピレングリコールのバイアルからサンプリングし、そして0.5mlのメタノ

ールで希釈した。Transcutolバイアルから、0.1mlをサンプリングし、そして9.9 mlの50:50 Transcutol:PBSで希釈し、そして0.1mlをエタノールのバイアルからサンプリングし、そして50:50のエタノール:PBSで希釈した。パクリタキセル含量をHPLCで決定した。各決定を三連で実施した。

### C. 結果

37℃での各増強剤におけるパクリタキセルの溶解度を表1に列挙する。

表1：種々の透過増強剤におけるパクリタキセルの飽和濃度

増強剤	パクリタキセル濃度 (mg/ml)	
	平均	標準偏差
Transcutol®	346.85	2.59
エタノール	68.91	3.49
プロピレングリコール	21.56	0.11
イソプロピルミリステート	0.43	0.01
オレイン酸	0.31	0.01
Transcutol®:イソプロピル ミリステート(9:1 v:v)	353.93	0.42

オクタノール／水分配係数 $K_{o/w}$  を表2に列挙する。

表2：種々の増強剤溶液中のパクリタキセルのオクタノール／水分配係数

増強剤	$K_{o/w}$	標準偏差
Transcutol®	25.25	0.27
エタノール	6.88	0.13
プロピレングリコール	37.13	2.48
イソプロピルミリステート	∞	—
オレイン酸	∞	—

有効に作用させるために、パクリタキセルは生きている表皮の下層にまで皮膚を透過しなければならない。薬物が生きている表皮を透過することは確立されており、薬物は、100に近いオクタノール／水分配係数を有していなければならない (Hadgraft J.H.およびWalters K., Drug absorption enhancement, A.G. de Boers編, Harwood Publishers, 1994)。表1 および表2の結果に基づき、プロ

ピレングリコールおよびTranscutolが、パクリタキセルの溶解およびその油相から水相への分配の増強の最良の組合せを示した。

しかし、Transcutolおよびプロピレングリコールの両方によって産生される $K_{o/w}$ は、いくらか低くあり得、それゆえ、それらは、オクタノール相におけるパクリタキセルの溶解度を増大するために無限大の $K_{o/w}$ を有するイソプロピルミリステートと合わされた。イソプロピルミリステートおよびTranscutolを1：9の容積比で混合した。イソプロピルミリステートは、Transcutol中に室温で容易に溶解した。均質な相を形成させるために、プロピレングリコールおよびイソプロピルミリステートもまた、エタノールと、4:3.5:0.5のプロピレングリコール：エタノール：イソプロピルミリステートの比で混合した。 $K_{o/w}$ の結果を表3に示す。

表3：増強剤の組合せにおけるパクリタキセルのオクタノール／水分配係数

増強剤	$K_{o/w}$	標準偏差
Transcutol®：イソプロピルミリステート (9:1)	43.45	0.43
プロピレングリコール：エタノール：イソプロピルミリステート (4.0:3.5:0.5)	42.39	1.66

イソプロピルミリステートのTranscutolへの添加は、分配係数の有意な増加をもたらした。しかし、プロピレングリコール：エタノール：イソプロピルミリステート溶液の分配係数は、プロピレングリコール単独の分配係数よりも有意な改良をもたらさなかった。この最後の結果、およびエタノールが乾癬状態を悪化させるという事実によって、この増強剤の組合せを、さらなる考慮から効率的に除外した。さらに、イソプロピルミリステートの添加は、実際に、パクリタキセルの溶解度をTranscutol単独における溶解度よりも増加させた。パクリタキセルのTranscutolにおける溶解度は346.9mg/mlであったが、イソプロピルミリステートの組合せにおいては、Transcutol：溶解度は353.9mg/mlに増加した。従って、この増強剤の組合せを皮膚研究に選択した。

## 実施例17

## 局所的パクリタキセル処方物の調製および分析

A. パクリタキセル軟膏Aの調製

Transcutol (3.2g)、イソプロピルミリステート (0.3g)、ラブラソール (2.5g)、パクリタキセル (0.01g) および $0.5\text{mCi/ml}$   $^3\text{H}$ -パクリタキセル (0.3ml) を、20mlのシンチレーションバイアル中で合わせた。別々のシンチレーションバイアル中に、ラブラフィル (2.5g)、アルラセル165 (1.2g) およびコンプリトール (0.3g) を合わせ、そして完全に融解するまで70℃で加熱した。最初のシンチレーションバイアルの内容物をこの融解物に添加し、均質になるまでボルテックスし、そして放冷した。

B. パクリタキセル軟膏Bの調製

Transcutol (2.5g)、イソプロピルミリステート (1.0g)、ラブラソール (labrasol) (2.5g)、パクリタキセル (0.01g) および $0.5\text{mCi/ml}$   $^3\text{H}$ -パクリタキセル (0.3ml) を、20mlのシンチレーションバイアル中で合わせた。別々のシンチレーションバイアル中に、ラブラフィル (labrafil) (2.5g)、アルラセル (ar lacel) 165 (1.2g) およびコンプリトール (compritol) (0.3g) を合わせ、そして完全に融解するまで70℃で加熱した。最初のシンチレーションバイアルの内容物をこの融解物に添加し、均質になるまでボルテックスし、そして放冷した。

C. 皮膚の調製、および透過研究

凍結し、切除したユカタンミニブタの皮膚を使用するまで-70℃に保存した。皮膚サンプルを、凍結皮膚からディスクを穴開けするためのno.10のコルク穴開け器を用いて調製した。サンプルをストレプトマイシン-ペニシリン溶液でリンスし、そして凍結用バッグに入れ、そして-70℃で保存した。

皮膚切片を、角質層を上にしてFranz拡散セル上にマウントした。底の受取溶液はR.0水中の0.05%アモキシシリン溶液であった。供与セルを、各皮膚表面に取り付けた。パクリタキセル軟膏を融解するまで (40~50℃) 加熱し、そしてシリンジ中に入れた。まだ融解している間に、0.1mlを各皮膚表面に押し出した。供与セルをガラスディスクで覆い、そしてこの集合体を24時間放置した。

24時間後、セルを取り外し、過剰な軟膏を除去し、そしてシンチレーションバイアルに保存した。皮膚表面を、3mlのジタロロメタン (DCM) で素早く洗浄し、そして乾燥させた。洗浄DCMを過度の軟膏と同じバイアルに保存した。皮膚切片および受取溶液を別々のシンチレーションバイアルに入れた。皮膚を $-30^{\circ}\text{C}$ で $30\text{ }\mu\text{m}$ 断片に凍結切片化 (cryotome) し、そして別々のバイアルに採取した。最初に刈り取ったものおよび残っている皮膚もまた、別々のバイアルに採取した。切片化した皮膚サンプルを各バイアルに0.5mlの組織溶解剤を添加することにより溶解した。サンプルを一晩放置して室温で溶解させた。翌日、3mlのシンチレーション混液をバイアルに添加した。DCM洗浄溶液について、 $100\text{ }\mu\text{l}$ を1mlのア

セトニトリルに移し、次いで3mlのシンチレーション混液を添加した。全ての溶液の放射能を $\beta$ カウンターを用いて測定した。

皮膚サンプルをFranz分散セルにマウントし、そして3群に分割した。各サンプルを適切に処置した (処置なしまたはパクリタキセル含有軟膏Bもしくは非含有軟膏B)。24時間後、サンプルを取り出し、そして標準的な組織学技術を用いて処理した。

#### D. 結果

組織学的切片から、処理していない皮膚の角質層切片が $50\sim 120\text{ }\mu\text{m}$ の間の厚さであることが見い出された一方、生きている表皮は $400\sim 700\text{ }\mu\text{m}$ の厚さであった。3%w/wイソプロピルミリスレートを含んだ軟膏 (軟膏A) について、皮膚におけるパクリタキセルの濃度は、角質層および生きている表皮全体において、本質的に $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  ( $1.2\times 10^{-6}\text{ M}$ ) で一定であった。10%w/wイソプロピルミリスレートを含んだ軟膏 (軟膏B) について、パクリタキセルの濃度は、角質層および生きている上皮全体において、一定であったが、角質層においてより高かった ( $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ 対 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ )。各軟膏試験のための受取溶液中の放射能は存在せず、このことは、パクリタキセルが皮膚切片を完全には透過しなかったことを示唆した。

パクリタキセルを含む軟膏を適用した場合、全体としては差異は認められなかった。

## 実施例18

## 乾癬の処置のためのパクリタキセルの全身用処方物の開発

乾癬の重篤な症例において、より積極的な処置が受容可能と見なされ、それゆえパクリタキセルでの全身処置に関連する毒性は受容可能であり得る。

パクリタキセルのための全身用処方物は、両親媒性ジブロックコポリマー (copolymer) を含む。このコポリマーは、水溶液中で、水中で疎水性の芯および親水性の殻からなるミセルを形成する。ポリ (DL-ラクチド) - ブロック - メトキシポリエチレングリコール (PDLLA-MePEG)、ポリカプロラクトン - ブロック - メトキシポリエチレングリコール (PCL-MePEG) およびポリ (DL-ラクチド-コ-カ

プロラクトン) - ブロック - メトキシポリエチレングリコール (PDLLACL-MePEG) のジブロックコポリマーは、大量融解重合化手順 (bulk melt polymerization procedure)、または類似の方法を用いて合成され得る。手短には、所定量のモノマーDL-ラクチド、カプロラクトン、および異なる分子量を有するメトキシポリエチレングリコールを加熱 (130°C) して、窒素通気下で融解させ、そして攪拌した。触媒オクタン酸スズ (0.2%w/w) を融解したモノマーに添加した。重合化を4時間実施した。分子量、臨界ミセル濃度、および最大のパクリタキセルを充填したを、それぞれ、GPC、蛍光、および溶解性試験で測定した (図22)。高いパクリタキセル保有能力が得られた。パクリタキセルを溶解する能力は、組成物およびコポリマーの濃度に依存する (図22および図23)。PDLLA-MePEGが最も安定した溶解パクリタキセルを与えた (図23および図24)。

ポリマーミセルの内部芯内の強力な会合は、パクリタキセルのような疎水性薬物を運ぶための高容量の環境を提示する。これらの薬物は、ブロックコポリマーと共有結合してミセル構造を形成し得るか、または物理的にミセルの疎水性の芯内へと取り込まれ得る。ミセルからの薬物放出の機構は、芯からの拡散および単一のポリマー鎖とミセルとの間の交換を含む。小さな大きさのミセル (通常100nm未満) は、大きな粒子の注射に関連する困難を解消する。

## 実施例19

## サーモペーストの生成手順

20mlガラスシンチレーションバイアル中の5gのポリカプロラクトン（分子量10,000～20,000）（Polysciences, Warrington Penn. USA）を50mlの測定した水を含む600mlビーカー中へ入れた。ビーカーを穏やかに65℃に加熱し、そしてその温度をポリマーが融解するまで20分間維持した。既知量のパクリタキセルまたは他の血管形成インヒビターを、65℃で完全に混合して融解ポリマーとした。融解ポリマーを予め加温した（60℃オープン）鋳型へ注ぎ、そしてポリマーが固化するまで放冷した。ポリマーを小片（約2mm×約2mmの大きさ）に切り、そして1mlのガラスシリンジに入れた。

次いで、ガラスシリンジを、ポリマーが完全に融解するまで、65℃（コーニンググホットプレート）で蒸留水を含む500mlガラスビーカー中に直立して置いた（下向きに先端に栓をした）。次いで、プランジャをシリンジに挿入して融解ポリマーを容器の先端で粘着性の塊へと圧縮した。シリンジにキャップをし、そして室温にまで放冷した。

適用のために、シリンジを60℃に再加熱し、そして体温にまで冷却した場合に固化する液体として投与した。

#### 実施例20

PDLLA-PEG-PDLLAおよび低分子量ポリ（D,L乳酸）を用いたサーモペーストからの  
パクリタキセルの放出の改変

##### A. PDLLA-PEG-PDLLAおよび低分子量PDLLAの調製

DL-ラクチドをAldrichから購入した。分子量8,000を有するポリエチレングリコール（PEG）、オクタン酸スズ、およびDL-乳酸をSigmaから得た。分子量20,000を有するポリ-ε-カプロラクトン（PCL）をBirmingham Polymers（Birmingham, AL）から得た。パクリタキセルをHauser Chemicals（Boulder, CO）から購入した。狭い分子量分布を有するポリスチレン標準をPolysciences（Warrington, PA）から購入した。アセトニトリルおよび塩化メチレンはHPLC級であった（Fisher Scientific）。

PDLLA-PEG-PDLLAのトリブロックコポリマーを開環重合化によって合成した。異なる比のDL-ラクチドのモノマーおよびPEGを混合し、そして0.5重量%のオク



タン酸スズを添加した。重合化を150℃で3.5時間実施した。低分子量PDLLAを、D-乳酸の重縮合によって合成した。反応をガラスフラスコ内で穏やかな窒素パージ、機械攪拌、および180℃での1.5時間の加熱の条件下で実施した。PDLLAの分子量は、カルボン酸末端基を力価測定することによって、約800と測定された。

#### B. ペースト処方物の製造

パクリタキセルを20%または30%の充填で、約60℃で融解させた、PDLLA-PEG-PDLLAコポリマーまたはPDLLA:PCL 90:10、80:20、および70:30の混和物のいずれかの中で完全に混合した。パクリタキセルを充填したペーストを1mlシリン

ジ中で重量測定し、そして4℃で保存した。

#### C. PDLLA-PEG-PDLLAおよびペースト混和物の特徴付け

PDLLA-PEG-PDLLAコポリマーの分子量および分布を、周囲温度で、 $10^4$  ÅのHewlett Packard Plゲルカラムに連結したShimadzu LC-10AD HPLCポンプおよびShimadzu RID-6A屈折指標検出器 (Kyoto, Japan) を用いるGPCによって法定した。移動相はクロロホルムで、流速は1ml/分であった。サンプルの注射容積は、0.2% (w/v) のポリマー濃度で20  $\mu$ lであった。ポリマーの分子量を、ポリスチレン標準と比較して決定した。CHCl<sub>3</sub>中のPDLLA-PEG-PDLLAの25℃での固有粘度をCannon-Fenske粘度計を用いて測定した。

コポリマーの熱分析を、TA Instruments 2000コントローラーおよびDuPont 91 OS DSC (Newcastle, Delaware) を用いて、示差走査熱量測定 (DSC) によって実施した。加熱速度は、10℃/分であり、そしてコポリマーおよびパクリタキセル/コポリマーマトリクスサンプルを、襲付き開放型アルミニウム試料天秤皿において重量測定した (3~5 mg)。

<sup>1</sup>H核磁気共鳴 (NMR) を使用して、ポリマーの化学組成を決定した。パクリタキセルを充填したPDLLA-PEG-PDLLAの<sup>1</sup>H NMRのスペクトルをCDCl<sub>3</sub>中で、NMR装置 (Bruker, AC-200E) を200MHzで用いて得た。ポリマーの濃度は1~2%であった。

パクリタキセル/PDLLA-PEG-PDLLAペーストの形態を、走査型電子顕微鏡 (SEM) (Hitachi F-2300) を用いて検査した。サンプルを、Hummer装置 (Technics、

USA) を用いて60% Auおよび40% Pdで覆った(厚さ10~15nm)。

#### D. パクリタキセルのインビトロ放出

20%パクリタキセルを充填したPDLLAPCLペーストの小ペレット(約2mg)または20%パクリタキセルを充填したPDLLA-PEG-PDLLAペーストのシリンダー(シリンジを通して溶融ペーストを押し出しすることにより作製された)を、0.4g/Lアルブミンを有する10mlリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.4)を含む、蓋をした14mlガラス管中に入れた。管を、穏やかに旋回して混合させながら37℃でイン

キュベートした。パクリタキセル分析のために、上清を定期的に取り出し、そして新鮮なPBS/アルブミン緩衝液と置き換えた。上清(10ml)を1ml塩化メチレンで抽出した。水相をデカントし、そして塩化メチレン相を60℃の窒素流下で乾燥した。乾燥残渣を40:60の水:アセトニトリル混合液中に再構成し、そして約1分間10,000gで遠心分離した。次いで、上清中のパクリタキセルの量をHPLCにより分析した。HPLC分析を、110AポンプおよびC-8超球(ultrasphere)カラム(Beckman)、ならびにSPD-6A UV検出器(232nmに設定)、SIL-9A自動注入器およびC-R3Aインテグレーター(Shimadzu)を用いて実施した。注入容積は20 $\mu$ lであり、流速は1ml/分であった。移動相は、58%アセトニトリル、5%メタノール、および37%蒸留水であった。

#### E. 結果および考察

ポリスチレン標準に関するPDLLA-PEG-PDLLAの分子量および分子量分布を、GPCにより測定した(図30)。25℃でのCHCl<sub>3</sub>中のコポリマーの固有粘度を、Canon-Fenske粘度計を用いて測定した。分子量および固有粘度は、PEG含量の増加に伴って減少した。10%~40%のPEG含量を伴うPDLLA-PEG-PDLLAの多分散性は2.4~3.5であった。しかし、70%PEGを伴うコポリマーは、狭い分子量分布を有し、これは1.21の多分散性であった。これは、ポリマー分子量の広い分布を生じる側鎖反応(例えば、エステル交換)の機会を減少させる高PEG含量に起因し得る。あるいは、疎水性-親水性ブロックコポリマーのコイル状構造は、人為的な低い多分散性値を生じ得る。

純粋PEGおよびPDLLA-PEG-PDLLAコポリマーのDSC走査を、図25および26に

示す。70%および40%のPEG含量を伴うPEGおよびPDLLA-PEG-PDLLAは吸熱ピークを示し、コポリマーのPEG含量が低下するにつれてエンタルピーおよび温度の低下を伴った。40%および70%のPEGのコポリマーの吸熱ピークは、おそらくPEG領域の溶融に起因した。これは、相分離の発生を示す。純粋PEGは鋭い溶融ピークを有したが、70%および40%PEGの両方のコポリマーはブ充填なピークを示し、70%PEGの場合、明瞭なショルダーを有した。ブ充填な溶融ピークは、PDLLAがPEGの結晶化を妨害することから生じたとされ得る。70%PEGの場合におけるショル

ダーは、PDLLA領域のガラス転移を表し得る。10~250℃の温度範囲における10%、20%、および30%のPEG含量を伴うコポリマーでは、温度変化は生じなかった。これは、有意な結晶化が生じなかった（従って、相分離であり得る）ことを示す。

パクリタキセルを含まないまたは20%パクリタキセルを含むPDLLA:PCL (70:30、80:20、90:10) ブレンドのDSCサーモグラムは、約60℃で吸熱ピークを示し、PCLの溶融から生じた。PDLLAの無定形性質およびその低い分子量(800)に起因して、PDLLAの溶融およびガラス転移は観察されなかった。パクリタキセルの再結晶または溶融に起因する温度変化は、観察されなかった。

20%および30%PEG含量のPDLLA-PEG-PDLLAコポリマーを、以下の理由のために、ペーストのための最適な処方材料として選択した：10%PEGのPDLLA-PEG-PDLLAは約60℃の温度で溶融され得なかった；40%および70%PEGのコポリマーは、60℃で容易に溶融し、そして20%および30%PEGコポリマーは、50℃~60℃の間で粘性の液体になった；そして40%および70%PEGコポリマーの水中での膨潤は非常に高く、水中でペーストの迅速な分散を生じた。

PDLLA-PEG-PDLLAシリンダーからのパクリタキセルのインビトロ放出プロフィールを図27に示す。40%PEGシリンダーからの放出を測定する実験は、シリンダーが非常に高い膨潤度を有し（1日で約200%の水分取り込み）、そして数日内で崩壊したので、終結した。30%PEGシリンダーからのパクリタキセルの放出割合は、70日間にわたり漸増した。20%PEGシリンダーからの放出割合は、30日までゆっくりと増大し、次いで急激に増大し、次いで別の漸増期間が続いた。各

個々のシリンダー（20%PEG含量）がパクリタキセル放出の急激な変化を示した程度で、有意な差異が存在した。急激な増大の前では、パクリタキセルの放出割合は、同じシリンダー直径（1mm）ではより低いPEG含量のコポリマーに対してより低い。40%および30%PEGシリンダーは、20%PEGシリンダーよりもずっと高いパクリタキセル放出速度を示した。例えば、30%PEGのシリンダーは、30日で、20%PEGシリンダーからの放出が2%であることに比較して、17%のパクリタキセルを放出した。より小さい直径を有するシリンダーは、より速い放出速度を生じ（例えば、30日で、0.65mmおよび1mmの直径を有する30%のPEGシリンダーは、それぞれ、26%および17%のパクリタキセルを放出した（図2.7））。

上記の観察は、シリンダーからのパクリタキセルの放出機構によって説明され得る。パクリタキセルは、光学顕微鏡で観察されるように結晶としてポリマー中に分散された。結晶は、ホットステージ顕微鏡により観察されるように、170℃でコポリマーマトリックス中に溶解し始め、そして180℃で完全に溶解した。20%パクリタキセルを充填したPDLLA-PEG-PDLLA（30%PEG）ペーストのDSCサーモグラムは、パクリタキセルについて小さな再結晶発熱（16J/g、190℃）および溶融吸熱（6J/g、212℃）を示した（図2.5）。これは、180℃の後に溶融したコポリマーからのパクリタキセルの再結晶を示す。このタイプの薬物/ポリマーマトリックスでは、パクリタキセルは、拡散および/またはポリマー侵食を介して放出され得た。

拡散制御の場合、薬物は、ポリマー中の分子拡散によって、および/または連結された薬物粒子により形成された開口チャンネルを通じて放出され得る。従って、20%充填では、パクリタキセルのいくつかの粒子が単離され、そしてパクリタキセルは、コポリマー中の溶解に続く拡散によって放出され得る。パクリタキセルの他の粒子は、表面に連結するクラスターを形成し、チャンネル拡散を通じて放出され得た。両場合とも、より小さい寸法を有するシリンダーが、より短い拡散通路に起因してより速い薬物放出を与えた（図2.7）。

シリンダーの寸法変化および水分取り込みを、放出の間記録した（図2.8）。30%PEGシリンダーの長さ、直径、および湿潤重量の変化は急速に増大して2日

内に最大になり、約15日間変化しないままであり、次いで漸減した。シリンダーの開始直径は、膨潤挙動に影響を及ぼさなかった。20%PEGのシリンダーについては、長さは、1日で10%減少し、そして横這いになり、一方、直径および水分取り込みは時間の経過に伴って漸増した。コポリマー中のPEGが多くなるにつれてパクリタキセルの拡散を容易にするために水分をより多く取り込むので、より速い放出が観察された(図27)。

PDLLA-PEG-PDLLAペーストのコポリマー分子量低下をGPCによりモニターした。20%PEGシリンダーについては、ピーク位置の溶出容積は経時的に増大し、これは放出実験の過程の間にポリマー分子量が低下したことを示している(図30)。二相性の分子量分布が69日目に観察された。ポリマー分子量はまた、30%PEGシ

リンダー(1mmおよび0.65mm)について減少した。しかし、二相性分布は観察されなかった。

NMRスペクトルは、3.6ppmでPEGピークを、そして1.65ppmおよび5.1ppmでPDLLAピークを示した。コポリマーにおけるPDLLAに関するPEGのピーク面積は、69日目後に有意に減少した(図29)。これは、PDLLAからの解離後のPEGの溶解を示す。シリンダーの乾燥重量損失もまた記録した(図29)。これは、30%PEG-0.65mm>30%PEG-1mm>20%PEG-1mmの順で減少する分解速度を示す。

パクリタキセル放出前およびその間の乾燥シリンダーの形態学的変化をSEMを用いて観察した(図31)。簡単に述べれば、固体パクリタキセル結晶および無孔性ポリマーマトリックスが放出前に見られた(図31Aおよび31B)。放出の69日目後では、パクリタキセル結晶は観察されず、そしてマトリックスは、ポリマー分解および水分取り込みに起因して、多くの孔を含んだ(図31Cおよび31D)。

30%PEGシリンダーは、水中でたった2日後に多量の膨潤を示し(図28)、従って、脱離した水溶性PEGブロックおよび分解したPDLLA(すなわち、DL-乳酸オリゴマー)の拡散に対する障害が減少した。30%PEGシリンダーの質量損失および分解は継続的なもので、侵食放出の寄与は漸増し、いかなる急激な変化も伴う

ことのないパクリタキセルの持続放出を生じた（図27）。20%PEGシリンダーについては、膨潤は初期には低く（図28）、分解生成物の緩慢な拡散を生じた。従って、内部領域における分解生成物が主として保持され、一方、短い拡散通路に起因して、外部領域においては分解生成物はより少なかった。分解生成物は、分解速度を加速した。これは、オリゴマーのカルボン酸末端基が加水分解を触媒したからである。これは、二相性コポリマー分子量分布により示されるように、高分子量のシェルおよび低分子量の内部を生じた（図30、69日目）。シェル破裂は、シェルおよび内部分解生成物の強度、厚さ、および欠損のような要因に依存したので、内部分解生成物の損失の開始および程度は非常に可変性であった。シェル破裂は一貫せず、そしてポリマー中の薬物は、顕微鏡下で同質でなかったもので、放出バーストの時点およびバーストの程度は、試験した4つのサンプルにおいて異なっていた（図27）。

PDLLAおよびPCLブレンドならびに純粋PCLからのパクリタキセルの放出を、図32に示す。簡単に述べれば、放出割合は、ブレンド中のPDLLA含量に伴って増大した。例えば、10日以内で、80:20、70:30、および0:100 PDLLA:PCLからの放出パクリタキセルはそれぞれ、17%、11%、および6%であった。1日における初期バースト後、ほぼ一定の放出が80:20PDLLA:PCLペーストから得られた。有意な膨潤度は、放出の間で観察されなかった。PDLLA:PCLブレンドについては、PDLLAは、約800の非常に低い分子量を有したので、水溶性の生成物に急速に加水分解され、質量損失は長く遅れることはなかった。PCLは、ペーストが急速に崩壊することを防ぐ「保持(holding)」材として働いた。従って、放出速度は、分解の増強に起因するブレンド中のPDLLA含量に伴って増大した。PDLLAの継続的な侵食は、パクリタキセルの放出を制御し、そして一定の放出を生じた。純粋PCLからのパクリタキセルの放出は、おそらく、PCLの緩慢な分解速度（1～2年における）に起因して制御された拡散であった。

20%パクリタキセルを充填した90:10 PDLLA:PCLペーストについての放出研究においては、24時間のインキュベーション内でのペーストペレットの崩壊に起因して、困難に直面した。簡単に述べれば、最初の12時間のインキュベーションの

間、パクリタキセル放出についてシンク状態を確実にするために、サンプルを1時間毎に採取した。90:10ペーストからの放出パクリタキセルは、10時間内で25~35%であった。

30%パクリタキセルを含む90:10 PDLLA:PCLペーストは、20%パクリタキセルを含む90:10 PDLLA:PCLペーストより多くのパクリタキセルを放出した。従って、パクリタキセルの放出速度の調整は、ポリマーおよび化学療法剤の特性ならびに投与部位によって調節され、これは、局所療法の開発において重要であった。

### 実施例21

水溶性添加剤およびパクリタキセルを含有するポリマー性組成物の調製

#### A. ポリマー性組成物の調製

パクリタキセル/添加剤の共沈殿物の微粒子を調製し、続いてPCLに添加して

ペーストを形成させた。簡単に述べれば、パクリタキセル (100mg) を0.5mlのエタノール (95%) 中に溶解し、そして1.0mlの蒸留水中に予め溶解または分散した添加剤 (100mg) と混合した。混合物を、平滑状のペーストが形成されるまで粉末化した。ペーストをペトリ皿上に拡げ、37℃で一晩風乾した。乾燥塊を乳鉢および乳棒を用いて粉碎し、そしてメッシュ#140 (106  $\mu$ m) 篩 (Endecotts Test Sieves Ltd, London, England) を通過させた。次いで、微粒子 (40%) を、65℃で溶融PCL (60%) に組み込ませた。これは、パクリタキセルの20%充填に相当する。本研究に用いた添加剤は、ゼラチン (Type B、100ブルーム、Fisher Scientific)、メチルセルロース、(British Drug Houses)、デキストラン、T500 (Pharmacia, Sweden)、アルブミン (Fisher Scientific)、および塩化ナトリウム (Fisher Scientific) であった。パクリタキセルと、ゼラチンまたはアルブミンとの微粒子を上記のように調製したが、メッシュ#60 (270  $\mu$ m) 篩 (Endecotts Test Sieves Ltd, London, England) を通過させて、ペーストからのパクリタキセルの放出に対する微粒子サイズの影響を評価した。ペーストをまた、10%、20%、または30%のゼラチン、および20%のパクリタキセルをPCL中に含有させるように調製し、薬物放出に対する添加剤の割合の影響を研究した。他に特定しない限り、PCL中に分散させた20%パクリタキセルを含有するペーストを

、放出速度研究についてコントロールとして供するために調製した。

#### B. 薬物放出研究

パクリタキセルを充填したペーストのほぼ2.5mgのペレットを、ネジ蓋付き管中で50mlの10mM PBS (pH7.4) 中に懸濁した。この管を37℃でとんぼ返りに転倒させ、そして所定の時間間隔で、49.5mlの上清を取り出し、0.45Atmメンブレンフィルターを通して濾過し、パクリタキセル分析のために保持した。各管中に等容量のPBSを入れ替え、本研究を通してシンク状態を維持した。分析のために、濾液を3×1mlのジクロロメタン (DCM) で抽出し、DCM抽出物を乾燥するまで窒素流下でエバポレートし、そして1mlアセトニトリル中に再溶解した。分析は、流速1ml/分の水：メタノール：アセトニトリル (37:5:58) の移動相を用いるHPLC (Beckman Isocratic Pump)、C18逆相カラム (Beckman)、および232nmでのUV検出器 (Shimadzu SPD A) によって行った。

#### C. 膨潤研究

パクリタキセル／添加剤／PCLペースト (メッシュサイズ#140 (およびゼラチンのみについては#60) のパクリタキセル—添加剤微粒子を用いて調製した) を押し出してシリンダーを形成させ、断片に切断し、秤量し、そして各断片の直径および長さをマイクロメーター (Mitutoyo Digimatic) を用いて測定した。断片を37℃で蒸留水 (10ml) 中に懸濁し、所定の間隔で水を捨て、シリンダー断片の直径および長さを測定し、そしてサンプルを秤量した。サンプルの形態 (水中に懸濁する前および後) を、走査電子顕微鏡 (SEM) (Hitachi F-2300) を用いて調べた。サンプルを、Hummer Instrument (Technics, USA) を用いて60%Auおよび40%Pdで被覆した (厚さ10~15nm)。

#### D. ニワトリ胚漿尿膜 (CAM) 研究

受精した家畜ニワトリ胚を、無殻培養前に、4日間インキュベートした。卵の中身を90%相対湿度および3%CO<sub>2</sub>でインキュベートし、インキュベーション6日目に、パクリタキセルを充填したペースト (6%パクリタキセル、24%セラチン、および70%PCLを含有する) またはコントロール (PCL中30%セラチン) ペーストの1mg断片をCAM表面上に直接置いた。2日曝露後、血管系を、ビデオカメラ



とつないだ実体顕微鏡を用いて調べた。次いで、画像信号をコンピューター上に表示し、画像をプリントした。

#### E. 結果および考察

共沈澱したパクリタキセルとゼラチンまたはアルブミンとの微粒子は、硬質でかつ脆弱であり、そして容易にPCL中に組み込まれた。一方、他の添加剤は、軟質の粒子を生成した。この粒子は、ペーストの調製の間に壊れる傾向を示した。

図33は、PCL中の20%パクリタキセル、または20%パクリタキセル、20%添加剤、および60%PCLを含有するペーストからのパクリタキセル放出の時間経過を示す。添加剤を伴うまたは伴わないPCLからのパクリタキセルの放出は、二相

性放出パターンに従った：まず、より速い薬物放出速度があり、その後薬物のより緩慢な薬物放出が起こった。ペーストからのパクリタキセルのより速い放出速度の初期期間は、表面に位置するパクリタキセルの溶解またはペーストの表層領域からのパクリタキセルの拡散に起因すると考えられた。放出プロファイルの続くより緩慢な相は、緩衝液と接触した薬物粒子の有効表面面積の減少、ポリマーマトリックスへの緩衝液の緩慢な進入、またはポリマーマトリックスを通る薬物の平均拡散通路の増大に起因し得る。

PCLからのパクリタキセルの放出プロファイルの両相は親水性添加剤の存在下で増大し、ゼラチン、アルブミン、およびメチルセルロースが、薬物放出速度の最大の増大を生じた（図33）。より小さなパクリタキセル-添加剤粒子（106  $\mu\text{m}$ ）を用いた場合と比較して、より大きなパクリタキセル-添加剤粒子（270  $\mu\text{m}$ ）をペーストを調製するために用いた場合、ポリマーマトリックスからのパクリタキセルの放出においてさらなる増大があった（図34）。添加剤（例えば、ゼラチン）の量の増大は、薬物放出の対応する増大を生じた（図34）。図35Aは、20%パクリタキセル、20%添加剤、および60%PCLを含有するペーストの膨潤挙動を示す。膨潤速度は、以下の順に従った：ゼラチン>アルブミン>メチルセルロース>デキストラン>塩化ナトリウム。さらに、膨潤速度は、より高い割合の水溶性ポリマーをペーストに添加したとき増大した（図35B）。ゼラチンまたはアルブミンを含むペーストは、最初の8~10時間内で急速に膨潤し、続

いて膨潤速度は、サンプルの体積の変化が40%より大きくなったとき減少した。より大きな(270  $\mu\text{m}$ ) パクリタキセルゼラチン粒子を用いて調製したペーストは、より小さい(106  $\mu\text{m}$ ) のパクリタキセルゼラチン粒子で調製したものよりも速い速度で膨潤した。全てのペーストは、体積が50%より大きく増大したとき崩壊した。SEM研究は、ペーストの膨潤にはマトリックスの亀裂が伴うことを示した(図3 6)。高い倍率では(図3 6 Cおよび3 6 D)、ペーストの表面上に、かつ膨潤後ゼラチンと密に結合した、針状または稈状のパクリタキセル結晶の形跡があった(図3 6 Cおよび3 6 D)。

疎水性ポリマーにおいて個別の粒子として包埋された浸透剤または膨潤剤のような親水性薬剤は、マトリックス侵食、ポリマーマトリックスを通る薬物の拡散、

ならびに／または水溶性添加剤の溶解によりマトリックスに作出された孔を通る拡散および／または対流の組み合わせによる薬物放出を生じた。疎水性ポリマー中に分散された浸透剤および膨潤性ポリマーは、吸水し(ウィッキング剤(wicking agent)として作用する)、溶解または膨潤し、そして隣接粒子間の隔壁(ポリマー層)を破裂させ得る膨圧を及ぼして、マイクロチャネルを作出し、従って、拡散または対流による周囲媒体への薬物分子の漏出を容易にする。ペーストマトリックスの膨潤および亀裂(図3 6)は同様に、マトリックスの内部全体にマイクロチャネルの形成を生じた。ポリマーの膨潤の異なる速度および程度(図3 5)が、観察されたパクリタキセル放出速度の差異(図3 3および3 4)の原因であり得る。

図3 7は、コントロールゼラチン-PCLペースト(図3 7 A) および20%パクリタキセルゼラチン-PCLペースト(図3 7 B) で処理したCAMを示す。CAMの表面上のペーストを、図中、矢印で示す。コントロールペーストを有するCAMは、正常な毛管網構造を示す。パクリタキセル-PCLペーストで処理したCAMは、血管退行および毛管網を欠損した域を一貫して示した。ペースト中の添加剤の組み込みは、無血管域の直径を顕著に増大した(図3 7)。

本研究は、PCLからのパクリタキセルのインビトロ放出が、パクリタキセル／

親水性ポリマー微粒子のPCLマトリックスへの組み込みにより増大され得たことを示す。マウスにおいて皮下腫瘍を処置することにおける処方物の効力を評価するインビボ研究もまた、パクリタキセル／ゼラチン／PCLペーストが腫瘍塊を有意に減少することを示した。水溶性薬剤のタイプ、微粒子サイズ、および添加剤の割合のような要因が、薬物の放出特性に影響を及ぼすことが示された。

## 実施例 2 2

### ナノペーストを製造するための手順

ナノペーストは、親水性ゲル中のミクロスフェアの懸濁液である。本発明の1つの局面において、ゲルまたはペーストは、標的組織の近くに薬物を充填したミクロスフェアを位置させる方法として、組織に塗布され得る。水ベースであれば、

ペーストはすぐに体液で希釈されるようになり、ペーストの固着性 (stickiness) の減少およびミクロスフェアが隣接組織に堆積される傾向を引き起こす。ミクロスフェアカプセル化薬物のプールが、これにより、標的部位の近くに位置される。

これらの実験で利用された試薬および装置は、ガラスビーカー、Carbopol 925 (製薬級、Goodyear Chemical Co.)、蒸留水、水酸化ナトリウム (1 M) 水溶液、水酸化ナトリウム (5 M) 水溶液、20%w/vで水中に懸濁した0.1 $\mu$ m～31 $\mu$ mのサイズ範囲のミクロスフェアを包含する (前記を参照のこと)。

#### 1. 5 %w/v Carbopolゲルの調製

十分量のcarbopolを1 M水酸化ナトリウムに添加し、5 %w/v溶液を達成させた。1 M水酸化ナトリウム中にcarbopolを溶解させるために、混合物を、ほぼ1時間静置させた。この時間の間、混合物を攪拌し、そして1時間後、pHを、5 M水酸化ナトリウムを用いて7.4に調整し、carbopolを完全に溶解させた。pHが7.4に達すると、ゲルを覆い、2～3時間静置させた。

#### 2. ナノペーストの製造についての手順

十分量の0.1 $\mu$ m～3 $\mu$ mのミクロスフェアを水に添加し、ミクロスフェアの20%懸濁液を生成した。Carbopolゲル (8 mlの5 %w/v) を、ガラスビーカー中に入

れ、2 mlの20%ミクロスフェア懸濁液を添加した。混合物を攪拌してミクロスフェアをゲル全体に分散させた。混合物を4℃で保存した。

### 実施例23

#### シクロデキストリンとのパクリタキセルの複合体形成

##### A. 材料

パクリタキセルをHauser Chemical Inc. (Boulder, Colorado) から入手した。リン酸二ナトリウム (Fisher)、クエン酸 (British Drug Houses)、ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン (HP  $\beta$  CD)、 $\gamma$ -シクロデキストリン ( $\gamma$ -C

D)、およびヒドロキシプロピル- $\gamma$ -シクロデキストリン (HP  $\gamma$  CD) をAmerican Maize-Products Company (Hammond, Indiana) から入手し、そして受け取った通りに使用した。

##### B. 方法

###### 1. 溶解度研究

過剰量のパクリタキセル (5 mg) を、種々の濃度の  $\gamma$ -CD、HP  $\gamma$ -CD、またはHP  $\beta$ -CDを含有する水溶液に添加し、そして37℃で約24時間穏やかに転倒させた。平衡化後、懸濁液のアリコートを通し、0.45  $\mu$ mメンブレンフィルター (Millipore) を通して濾過し、適切に希釈し、HPLCを用いて分析した。移動相は、1.0 ml/分の流速のアセトニトリル、メタノール、および水 (58:5:37) の混合物で構成された。10%までの種々の濃度のHP  $\beta$ -CDを含有する50:50の水およびエタノール (95%) で構成された溶媒中のパクリタキセルの溶解度もまた、調べた。さらに、パクリタキセルの溶解速度プロファイルを、2 mgのパクリタキセル (受け取った通り) を0%、5%、10%、または20%のHP  $\gamma$ -CD溶液に添加するか、あるいは2 mgの予め水和させたパクリタキセル (7日間水中に懸濁させることにより) を純水に添加し、37℃で穏やかに転倒させることにより、調べた。アリコートを種々の時間間隔で採取し、パクリタキセルについてアッセイした。

###### 2. 安定性研究

20%HP  $\beta$  CDまたはHP  $\gamma$  CDを含有する溶液はそれぞれ、3.9および5.2のpH値を有

した。シクロデキストリン溶液中のパクリタキセルの安定性を、種々の時間間隔で、37℃または55℃で、水または50:50の水-エタノール混合液中10%または20%HP  $\gamma$ -CDまたはHP  $\beta$ -CDを含有する溶液中のパクリタキセル (20mg/ml) をアッセイすることにより調べた。さらに、1%、2%、または5%HP  $\beta$ -CDを含有する溶液中のパクリタキセル (1  $\mu$ g/ml) の55℃での安定性を測定した。

### C. 結果

#### 1. 溶解度研究

パクリタキセルの溶解度は、研究した全体のCD濃度範囲にわたって増大した；HP  $\beta$ -CDは、パクリタキセルの溶解度の最大の増大を生じる (図38)。溶解度曲線の形状は、化学量論が1:1複合体より高次であることを示唆する。パクリタキセルは、HP  $\beta$ -CDおよびHP  $\gamma$ -CDの両方を伴うタイプA<sub>F</sub>曲線、ならびに  $\gamma$ -CDを伴うタイプA<sub>N</sub>曲線を形成した。HP  $\beta$ -CDの50%水溶液におけるパクリタキセルの溶解度は、37℃で3.2mg/mlであり、これは水におけるパクリタキセルの溶解度の約2,000倍であった。パクリタキセル-シクロデキストリンの一次複合体についての概算安定度定数 (図39から) は、 $\gamma$ -CD、HP  $\gamma$ -CD、およびHP  $\beta$ -CDに対してそれぞれ3.1、5.8、および7.2M<sup>-1</sup>であり、二次複合体についての概算溶解度定数は、 $\gamma$ -CD、HP  $\gamma$ -CD、およびHP  $\beta$ -CDに対してそれぞれ $0.785 \times 10^3$ 、 $1.886 \times 10^3$ 、および $7.965 \times 10^3$  M<sup>-1</sup>であった。実測安定度定数の値は、シクロデキストリンと共にパクリタキセルにより形成された包括複合体が主に二次複合体であることを示唆した。

50:50の水:エタノール混合液中のパクリタキセルの溶解度は、純水中の複合体形成について観察されるようなシクロデキストリン濃度の増大 (図40) に伴って増大した。50%エタノールの存在下でのパクリタキセルおよびHP  $\beta$ -CDの複合体形成の見かけ安定度定数 (26.57M<sup>-1</sup>) は、エタノール不在下の安定度定数より有意に低かった (約300倍)。安定度定数がより低いことは、エタノールの存在下の溶媒の誘電率または極性の変化に起因し得る。

0%、5%、10%、および20%  $\gamma$ -CD溶液中のパクリタキセルの溶解プロフィール (図41) は、純水またはシクロデキストリン溶液中のパクリタキセルの準安

定溶液の形成を説明する；溶液中のパクリタキセルの量は漸増し、最大に達し、そしてその後減少した。48時間水中に懸濁することにより予め水和したパクリタキセルサンプルを用いる溶解研究は、準安定溶液の形成を示さなかった。さらに、水和パクリタキセル（室温で真空オープン中で乾燥させた）のDSC分析は、60～110℃の間で2つのブ充填な吸熱ピークを示した。これらのピークには、水和物の存在を示す約4.5%重量損失（熱重量分析により測定した）が伴った。約2.1%の重量の損失は、パクリタキセル－水和物の形成を示唆する。従って、60℃～110℃の間のDSCピークの発生および約4.5%の重量の損失は、二水和物の存在を示

唆する。受け取ったパクリタキセルサンプルの60℃～110℃の間の吸熱ピーク（DSC結果）または重量損失（TGA結果）の形跡はなかった。従って、（受け取ったままの）パクリタキセルは無水であり、そして水中への懸濁の際に、これは溶解して過飽和溶液を形成し、より低い溶解度の水和物として再結晶した（図41）

。

## 2. 安定性研究

パクリタキセル分解は、シクロデキストリンの濃度に依存し、疑似一次分解速度論に従った（例えば、図42）。55℃での1%HPβ-CDを含有する溶液中のパクリタキセル（1μg/mlパクリタキセル）の分解速度は、より高いシクロデキストリン濃度での速度より速かった（ $k = 3.38 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ）。 $1.78 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  および  $0.96 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  の分解速度定数はそれぞれ、10%HPβ-CDおよびHPγ-CD中のパクリタキセルについて観察された。2、4、6、または8%HPβ-CDを含有するパクリタキセル溶液（1μg/ml）は、10または20%HPβ-CD溶液（20μg/ml）で得られたものとは分解速度において有意差は示さなかった。エタノールの存在は、シクロデキストリン溶液中のパクリタキセルの安定性に有害な影響を及ぼさなかった。

## D. 考察

本研究は、パクリタキセルの溶解度がシクロデキストリンとの複合体形成により増大し得ることを示した。これらの水性ベースのシクロデキストリン処方物は

、種々の炎症性疾患の処置において利用され得る。

#### 実施例 2 4

##### パクリタキセルの増大濃度を有するポリマー性組成物

PDLLA-MePEGおよびPDLLA-PEG-PDLLAは、疎水性 (PDLLA) および親水性 (PEGまたはMePEG) 領域を有するブロックコポリマーである。適切な分子量および化学組成で、それらは、疎水性PDLLAコアおよび親水性MePEGシェルの小さな凝集を形成し得る。パクリタキセルは、疎水性コアに充填され得、それにより増大した「溶解度」を有するパクリタキセルを提供する。

#### A. 材料

D,L-ラクチドを、Aldrichから購入し、オクタン酸第一スズ (Stannous octoate)、ポリ (エチレングリコール) (分子量8,000)、MePEG (分子量2,000および5,000) をSigmaから購入した。MePEG (分子量750) をUnion Carbideから購入した。コポリマーを、触媒としてオクタン酸第一スズを用いる開環重合手順によって合成した (Dengら、J. Polym. Sci., Polym, Lett. 28:411-416, 1990 ; Cohnら、J. Biomed. Mater. Res. 22:993-1009, 1988) 。

PDLLA-MePEGの合成について、DL-ラクチド/MePEG/オクタン酸第一スズの混合物を10mlガラスアンプルに添加した。アンプルをバキュームに連結し、そして炎で密封した。重合を、アンプルを150℃油浴中で3時間インキュベートすることにより達成した。PDLLA-PEG-PDLLAの合成について、D,L-ラクチド/PEG/オクタン酸第一スズの混合物をガラスフラスコに移し、ゴムストッパーで密封し、そして150℃オープン中で3時間加熱した。コポリマーの出発組成物を表 1 および 2 中に示す。全ての場合において、オクタン酸第一スズの量は0.5%~0.7%であった。

#### B. 方法

ポリマーをアセトニトリル中に溶解し、そして10,000 g で5分間遠心分離し、非溶解性の不純物を捨てた。次いで、パクリタキセルアセトニトリル溶液を各ポリマー溶液に添加し、10重量%のパクリタキセル (パクリタキセル+ポリマー) を有する溶液を与えた。次いで、溶媒アセトニトリルを除去し、窒素流および60

℃加温下で、透明なパクリタキセル／PDLLA-MePEGマトリックスを得た。蒸留水、0.9%NaCl生理食塩水、または5%デキストロースを、マトリックスの4倍重量で添加した。マトリックスをボルテックス混合および60℃での定期加温の助けを借りて、最終的に「溶解」した。透明な溶液が全ての場合において得られた。粒子サイズは、サブミクロン粒子サイズ測定器 (NICOMP Model 270) により測定されたように全て50nm未満であった。処方を表1に示す。

表1. パクリタキセル／PDLLA-MePEG\*の処方

PDLLA-MePEG	溶解媒体	パクリタキセル充填 (最終パクリタキセル濃度)
2000/50/50	水	10% (20mg/ml)
2000/40/60	水	10% (20mg/ml)
2000/50/50	0.9%生理食塩水	5% (10mg/ml)
2000/50/50	0.9%生理食塩水	10% (20mg/ml)
2000/50/50	5%デキストロース	10% (10mg/ml)
2000/50/50	5%デキストロース	10% (20mg/ml)

PDLLA-PEG-PDLLAの場合 (表2)、コポリマーは水中には溶解し得ないので、パクリタキセルおよびポリマーをアセトン中に共溶解した。水または水／アセトンの混合物をこのパクリタキセルポリマー溶液に徐々に添加し、パクリタキセル／ポリマー球の形成を誘導した。



表2. PDLLA-PEG-PDLLAの組成

コポリマー名	PEGの重量(g)	DL-ラクチドの重量(g)
PDLLA-PEG-PDLLA 90/10	1	9
PDLLA-PEG-PDLLA 80/20	2	8
PDLLA-PEG-PDLLA 70/30	3	7
PDLLA-PEG-PDLLA 60/40	4	6
PDLLA-PEG-PDLLA 30/70	14	6

\*PEG分子量。8,000。

### C. 結果

PDLLA-MePEG組成物の多くは、水、9%生理食塩水、または5%デキストロス中で透明な溶液を形成する。これは、ナノメーターの範囲の小さな凝集体の形成を示している。パクリタキセルは、PDLLA-MePEGミセルに首尾よく充填された。例えば、%充填（これは、1mlパクリタキセル/PDLLA-MePEG/水系中の10mgパクリタキセルを表す）で、透明な溶液が2000-50/50および2000-40/60から得られた。粒子サイズは約60nmであった。

### 実施例25

#### フィルム製造のための手順

用語フィルムは、多くの幾何学的形状の1つに形成されたポリマーを指す。フィルムは、薄い、弾性のポリマーシート、または2mm厚のポリマーディスクであり得る。そのいずれかが、続く癒痕および付着形成を防ぐように組織表面に適用され得る。このフィルムは、曝露された組織上に、カプセル化薬物が組織部位で長期にわたってポリマーから放出され得るように配置されるように設計した。フィルムは、いくつかのプロセスにより作製され得る。例えば、キャストイングによる、およびスプレーによることを包含する。

キャストイング法では、ポリマーを溶融して型に注入するか、ジクロロメタン

中に溶解し型に注入するかのいずれかを行った。次いで、それぞれポリマーは、それが冷却するにつれて固形化するか、または溶媒がエバポレートするにつれて固形化した。スプレー法では、ポリマーを溶媒に溶解し、ガラス上に吹き付け、そして溶媒がエバポレートするにつれてポリマーはガラス上で固形化した。繰り返し吹き付けは、ガラスから剥離され得るフィルムへのポリマーのビルドアップ (build up) を可能にした。

これらの実験において利用された試薬および装置は、小ビーカー、Corningホットプレートスターラー、キャストリング型 (例えば、50ml遠沈管キャップ) および型保持装置、20mlガラスシンチレーション蓋付きバイアル (プラスチックイ

ンサートタイプ)、TLC噴霧器、窒素ガスタンク、ポリカプロラクトン (「PCL」—分子量10,000~20,000; Polysciences)、パクリタキセル (Sigma 95%純度)、エタノール、「洗浄」 (前記を参照のこと) エチレンビニルアセテート (「EVA」)、ポリ (DL) 乳酸 (「PLA」—分子量15,000~25,000; Polysciences)、DCM (HPLC級; Fisher Scientific) を包含する。

### 1. フィルム製造のための手順—溶融キャストリング

既知重量のPCLを有する小さなガラスビーカーを、水の入ったより大きなビーカー (水浴として作用する) 中に置き、そしてポリマーが十分に溶融されるまで、70℃のホットプレート上に置いた。既知重量の薬物を溶融ポリマーに添加し、混合物を十分に攪拌した。溶融ポリマーを型に注入し、そして冷却させた。

### 2. フィルム製造のための手順—溶媒キャストリング

既知重量のPCLを20mlガラスシンチレーションバイアル中で直接秤量し、10%w/v溶液を達成するのに十分なDCMを添加した。溶液を混合した後、所望の最終パクリタキセル濃度を達成するのに十分なパクリタキセルを添加した。この溶液をボルテックスに供してパクリタキセルを溶解し、1時間静置させ (気泡の存在がなくなるまで)、次いでゆっくりと型に注入した。型を一晩換気フードに置き、DCMをエバポレートさせた。

### 3. フィルム製造のための手順—スプレー

十分量のポリマーを20mlガラスシンチレーションバイアル中で直接秤量し、2

%w/v溶液を達成するのに十分なDCMを添加した。溶液を混合してポリマーを溶解させた。自動化ピペットを用いて、適切な容積（最小5ml）の2%ポリマー溶液を、別の20mlガラスシンチレーションバイアルに移した。十分なパクリタキセルを溶液に添加し、蓋をしたバイアルを振盪することにより溶解した。スプレー用に調製するために、バイアルの蓋を外し、TLC噴霧器のバレルをポリマー溶液に突っ込んだ。

窒素タンクを噴霧器のガス注入口に連結し、そして圧力を噴霧および吹き付けが開始するまで漸増させた。型を、スプレー間に15秒乾燥時間を伴う5秒振動スプレーを用いて吹き付けた。吹き付けは、ポリマーの適切な厚さが型上に堆積されるまで続けた。

## 実施例 26

### エチレンビニルアセテートおよび界面活性剤で構成された 治療剤を充填したポリマー性フィルム

2つのタイプのフィルムを本実施例で調査した：パクリタキセルを充填した純粋EVAフィルムおよびパクリタキセルを充填したEVA/界面活性剤ブレンドフィルム。

試験される界面活性剤は2つの疎水性界面活性剤（Span 80およびPluronic L101）および1つの親水性界面活性剤（Pluronic F127）である。Pluronic界面活性剤はそれ自体、誘引性のポリマーであった。なぜなら、それらは、種々の薬物送達特性を至適化するためにEVAとブレンドされ得るからである。Span 80は、ポリマーマトリックス中に分散する小分子であり、ブレンドを形成しない。

界面活性剤は、フィルムからのパクリタキセルの放出速度を調整すること、およびフィルムの特定の物理的パラメーターを至適化することにおいて有用であった。薬物放出速度が制御され得ることを示した界面活性剤ブレンドフィルムの一つの局面は、化合物が水中で膨潤する速度および程度を変化させる能力であった。水のポリマー-薬物マトリックスへの拡散は、キャリアからの薬物の放出に重要であった。図43Cおよび43Dは、ブレンド中の界面活性剤のレベルが変化するにつれてのフィルムの膨潤度を示す。純粋EVAフィルムは、2ヶ月を超えて

も有意な程度に膨潤しなかった。しかし、EVAに添加される界面活性剤のレベルを増大させることにより、化合物の膨潤度を増大させることが可能であり、そして親水性を増大させることにより、膨潤が増大した。

これらのフィルムを用いた実験の結果を以下の図43A～Eに示す。簡単に述べれば、図43Aは、純粋EVAフィルムからの時間の経過に伴うパクリタキセル放出 (mg単位) を示す。図43Bは、同じフィルムに関して残存する薬物の割合

を示す。これらの2つの図面から理解され得るように、パクリタキセル充填が増大する（すなわち、パクリタキセル重量%が増大する）につれて、薬物放出速度が増大した。これは、予期された濃度依存性を示す。パクリタキセル充填が増大するにつれて、フィルム中に残存するパクリタキセルの割合もまた増大した。これは、充填がより高いことが、長期放出処方物にとってより魅力的であり得ることを示す。

フィルムの物理的強度および弾性を評価し、そして図43Eに示す。簡単に述べれば、図43Eは、純粋PVAおよびEVA/界面活性剤ブレンドフィルムについての応力/歪み曲線を示す。この応力の粗測定値は、フィルムの弾性がPluronic F127の添加を伴って増大すること、および引っ張り強度（破壊時の応力）がPluronic F127の添加を伴って濃度依存様式で増大することを実証した。弾性および強度は、化合物の永久変形を引き起こすことなく特定の臨床適用について操作されなければならないフィルムの設計において、重要な考慮要件である。

上記データは、特定の界面活性剤添加剤の、薬物放出速度を制御し、そしてビヒクルの物理的特性を変化させる能力を実証する。

## 実施例27

### ナノスプレーを製造するための手順

ナノスプレーは、生理食塩水中の小ミクロスフェアの懸濁液である。ミクロスフェアが非常に小さい（すなわち、直径1  $\mu\text{m}$ 以下である）場合、それらは、懸濁液が重力下でも沈降しないようなコロイドを形成する。以下により詳細に説明するように、0.1  $\mu\text{m}$ ～1  $\mu\text{m}$ の微粒子の懸濁液が、手術時における直接の（例えば、血管癒合のために）、ラプロスコピック(laprosopic)介入を介する、また

は指ポンプエアロゾルによる（例えば、局所的に送達される）、組織上のエアロゾル化堆積に適切のように作製され得る。ナノスプレーを製造するために利用された装置および材料は、200ml水ジャケットビーカー（KimaxまたはPyrex）、Haa ke循環水浴、2インチ直径を有するオーバーヘッドスターラーおよびコントローラー（4ブレードのプロペラタイプのステンレス鋼スターラー；Fisher商標）、

500mlガラスビーカー、ホットプレート／スターラー（Corning商標）、4×50mlポリプロピレン遠沈管（Nalgene）、プラスチックインサートキャップを有するガラスシンチレーションバイアル、卓上遠心機（Beckman）、高速遠心床モデル（JS 21 Beckman）、Mettler分析用天秤（AJ 100, 0.1mg）、Mettlerデジタル天井荷重天秤（AE 163, 0.01mg）、自動化ピペッター（Gilson）、滅菌ピペットチップ、ポンプ作動エアロゾル（Pfeiffer pharmaceuticals）20ml、層流フード、PCL（分子量10,000～20,000；Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA）、「洗浄」（前記を参照のこと）EVA、PLA（分子量15,000～25,000；Polysciences）、ポリビニルアルコール（「PVA」一分子量124,000～186,000；99%加水分解；Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI USA）、DCMまたは「塩化メチレン」；HPLC級Fisher Scientific）、蒸留水、滅菌生理食塩水（BectonおよびDickens onまたは等価物）を包含する。

#### 1. 5% (w/v) ポリマー溶液の調製

調製されるポリマー溶液に依存して、以下を20mlガラスシンチレーションバイアル中で直接秤量した：1.00 gのPCLもしくはPLA、または0.50 gの各PLAおよび洗浄EVA。メスシリンダーを用いて、20mlのDCMを添加し、そしてバイアルの蓋をきつく閉めた。全てのポリマーが溶解するまで、バイアルを室温（25℃）で静置させた。

#### 2. 3.5% (w/v) PVAストック溶液の調製

溶液を、以下に示す手順に従うか、またはミクロスフェアの製造のために調製した5% (w/v) PVAストック溶液（実施例28を参照のこと）を希釈することにより調製した。簡単に述べれば、17.5 gのPVAを600mlガラスビーカー中で直接秤量し、そして500mlの蒸留水を添加した。ビーカーを覆い、300mlの水を入れた20

00mlガラスビーカー中に置いた。PVAを85℃で300rpmで、十分に溶解するまで攪拌した。

### 3. ナノスプレーの製造のための手順

簡単に述べれば、100mlの3.5%PVA溶液を、連結されたHaake水浴を有する200ml水ジャケットビーカー中に置いた。ビーカーの中身を3000rpmで攪拌し、10mlのポリマー溶液（製造されるナノスプレーのタイプに基づいてポリマー溶液を用いた）を、5ml自動化ピペッターを用いて2分間にわたって、攪拌中のPVAに滴下した。3分後、攪拌速度を、2.5時間、2500rpm (+/-200rpm) に調整した。2.5時間後、攪拌ブレードをナノスプレー調製物から取り出し、10mlの蒸留水でリンスし、リンス溶液もナノスプレー調製物中に入るようにした。

ミクロスフェア調製物を500mlビーカーに流し込んだ。ジャケット水浴を70mlの蒸留水で洗浄し、この70mlリンス溶液もミクロスフェア調製物中に入るようにした。180mlミクロスフェア調製物をガラス棒で攪拌し、4つのポリプロピレン50ml遠沈管に等分に流し込み、10,000g (+/-1000g) で10分間遠心分離した。PVA溶液を各ミクロスフェアペレットから排水して捨てた。蒸留水（5ml）を各遠沈管に添加し、これをボルテックスに供した。4つのミクロスフェア懸濁液を20mlの蒸留水を用いて1つの遠沈管中にプールし、そして10,000g (+/-1000g) で10分間遠沈した。上清をミクロスフェアペレットから排水し、そして40mlの蒸留水を添加し、そしてミクロスフェア調製物をボルテックスに供した（このプロセスを3回繰り返した）。次いで、ミクロスフェア調製物を予め秤量したガラスシンチレーションバイアルに移した。

バイアルを、室温（25℃）で1時間静置させ、2  $\mu\text{m}$  および 3  $\mu\text{m}$  直径ミクロスフェアを重力下で沈降させた。1時間後、上部の9mlの懸濁液を排水し、滅菌キャップした50ml遠沈管に入れ、そして10,000 (+/-1000g) で10分間遠心分離した。上清を捨て、そしてペレットを20mlの滅菌生理食塩水中に、懸濁液を10,000g (+/-1000g) で10分間遠心分離することにより再懸濁した。上清を捨て、そしてペレットを滅菌生理食塩水中に再懸濁した。使用する生理食塩水の量は、最終の必要とされる懸濁液濃度（通常10%w/v）に依存した。ナノスプレー懸濁液をエ

アロゾルに添加した。

## 実施例28

### ミクロスフェアの製造

ミクロスフェアを製造するのに用いられる装置には、以下のものが挙げられる：  
200mlウォータージャケットビーカー（KimaxまたはPyrex）、Haake循環水浴、  
2インチの直径を有するオーバーヘッドスターラーおよびコントローラー（4枚刃の、プロペラ型ステンレススチールスターラー-Fisher製）、500mlガラスビーカー、ホットプレート/スターラー（Corning製）、4×50mlポリプロピレン遠心管（Nalgene）、プラスチック挿入キャップ付きガラスシンチレーションバイアル、卓上型遠心分離機（GPR Beckman）、高速遠心分離機-フロアモデル（JS 21 Beckman）、Mettler化学天秤（AJ 100、0.1mg）、Mettlerデジタルトップロードイング天秤（AE 163、0.01mg）、自動ピペッター（Gilson）。試薬には以下のものが挙げられる：PCL（分子量10,000～20,000；Polysciences, Warrington Pennsylvania, USA）、「洗浄した」（下記の「洗浄」の方法を参照のこと）EVA、PLA（分子量15,000～25,000；Polysciences）、ポリビニルアルコール（「PVA」-分子量124,000～186,000；99%加水分解化；Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI, USA）、DCMまたは「塩化メチレン」；HPLCグレード、Fisher Scientific、および蒸留水。

#### A. 5% (w/v) ポリマー溶液の調製

DCL (1.00g) もしくはPLA、またはPLAおよび洗浄したEVAの各0.50gを、20mlガラスシンチレーションバイアルに直接量り入れた。次いで、20mlのDCMを添加した。バイアルにキャップをし、室温（25℃）で、1時間（場合によっては振盪を用い得る）、または全てのポリマーが溶解するまで、保存した。この溶液は室温で、少なくとも2週間保存し得る。

#### B. 5% (w/v) PVAストック溶液の調製

25gのPVAを600mlガラスビーカーに直接量り取り、そして3インチのTeflonコートした攪拌子と共に500mlの蒸留水を添加した。ビーカーを蒸発損失を減少させるためにガラスで蓋をし、300mlの水を含有する2000mlのガラスビーカーに入

れた。PVAを300rpm、85℃（Corningホットプレート/スターラー）で、2時間または完全に溶解するまで、攪拌した。PVAの溶解を視覚的チェックで決定した；

溶液は透明であるべきである。溶液をガラススクリュートップ保存容器に移し、4℃で最高2ヶ月間保存した。しかしながら、溶液を使用前または希釈前に室温まで加温しなければならない。

### C. ミクロスフェアを生成する手順

作成するミクロスフェアのサイズに基づき（表1参照）、100mlのPVA溶液（表1に示す濃度）を200mlウォータージャケットビーカーに入れた。Haake循環水浴をこのビーカーに接続し、内容物を27℃（+/- 1℃）で、10分間平衡化した。作成するミクロスフェアのサイズに基づき（表I参照）、オーバーヘッドスターラーの開始速度を設定し、そしてオーバーヘッドスターラーの刃をPVA溶液中に中程まで降ろした。次に、スターラーを開始し、次いで、10mlのポリマー溶液（生成するミクロスフェアの型に基づいて用いるポリマー溶液）を、2分間にわたって、5ml自動ピペッターを用いて攪拌しているPVA中に滴下した。3分後、攪拌速度を調整し（表1参照）、溶液をさらに2.5時間攪拌した。次いで、攪拌刃をミクロスフェア調製物から取り除き、そして10mlの蒸留水でリンスし、その後、リンス溶液をミクロスフェア調製物中に流し込んだ。次いで、ミクロスフェア調製物を500mlビーカーに注ぎ入れ、そしてジャケット水浴を70mlの蒸留水で洗浄した。これをまた、ミクロスフェア調製物中に流し込んだ。次いで、180mlのミクロスフェア調製物をガラス棒で攪拌し、等量を4個のポリプロピレン50ml遠心管に注ぎ込んだ。次いで、管を蓋し、そして10分間遠心分離した（表1に示した力）。各ミクロスフェアのペレットから45mlのPVA溶液を抜き取った。



表 1

各直径範囲のミクロスフェアに対するPVA濃度、攪拌速度、および遠心力の要件

生成段階	ミクロスフェア直径範囲		
	30 $\mu\text{m}$ ~ 100 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$ ~ 30 $\mu\text{m}$	0.1 $\mu\text{m}$ ~ 3 $\mu\text{m}$
PVA濃度	2.5% (w/v) (すなわち、蒸留水で5%ストックを希釈)	5% (w/v) (すなわち、未希釈ストック)	3.5% (w/v) (すなわち、蒸留水で5%ストックを希釈)
開始攪拌速度	500rpm +/- 50rpm	500rpm +/- 50rpm	3000rpm +/- 200rpm
調整攪拌速度	500rpm +/- 50rpm	500rpm +/- 50rpm	2500rpm +/- 200rpm
遠心力	1000g +/- 100g (卓上型)	1000g +/- 100g (卓上型)	10000g +/- 1000g (高速型)

次いで、5mlの蒸留水を各遠心管に添加し、ボルテックスしてミクロスフェアを再懸濁した。次いで、4つのミクロスフェア懸濁液を1つの遠心管に、20mlの蒸留水と共にプールし、そしてさらに10分間遠心分離した(表1に示す力)。このプロセスを、合計で3回洗浄するためさらに2回繰り返した。次いで、ミクロスフェアを最後に1回遠心分離し、10mlの蒸留水で再懸濁した。最終洗浄後、ミクロスフェア調製物を予め秤量したガラスシンチレーションバイアル中に移した。バイアルをキャップし、そしてミクロスフェアを重力下で沈降させるため、室温(25℃)で一晩放置した。0.1 $\mu\text{m}$ ~3 $\mu\text{m}$ のサイズ範囲に該当するミクロスフェアは重力下で沈降しないので、これらは10mlの懸濁液中に残された。

#### D. 10 $\mu\text{m}$ ~ 30 $\mu\text{m}$ または 30 $\mu\text{m}$ ~ 100 $\mu\text{m}$ の直径のミクロスフェアの乾燥

ミクロスフェアを室温で一晩放置した後、上清を沈降したミクロスフェアから流し出した。ミクロスフェアを蓋をしていないバイアルで、引き出しの中で、1週間の間またはこれらが完全に乾燥するまで(一定重量のバイアル)、乾燥した。より速い乾燥は、蓋をしていないバイアルを、ヒュームフード中、窒素ガスの緩

慢な流動下(流速約10ml/分)に放置することにより達成され得る。完全に乾燥した時(一定重量のバイアル)、バイアルを秤量し、蓋をする。ラベルを貼り、

蓋をしたバイアルを、室温で、引き出し中に保存した。ミクロスフェアは通常、3ヶ月しか保存されなかった。

#### E. 0.1 $\mu\text{m}$ ~ 3 $\mu\text{m}$ 直径のミクロスフェアの懸濁液の濃度測定

このサイズ範囲のミクロスフェアは沈降せず、そのためこれらは4℃で、最大4週間懸濁液のままであった。10mlの懸濁液中のミクロスフェアの濃度を測定するため、懸濁液の200  $\mu\text{l}$  のサンプルを1.5mlの予め秤量した微量遠心管中にピペッティングした。次いで、管を10,000gで遠心分離し（Eppendorf卓上微量遠心機）、上清を取り除き、そして管を50℃で一晩乾燥させた。次いで、管中の乾燥させたミクロスフェアの重量を測定するために管を再秤量した。

#### F. パクリタキセルを充填したミクロスフェアの製造

パクリタキセル含有ミクロスフェアを調製するため、適切な量の秤量したパクリタキセル（カプセル化されるべきパクリタキセルのパーセントに基づく）を、20mlガラスシンチレーションバイアル中に直接入れた。次に、10mlの適切なポリマー溶液をパクリタキセル含有バイアルに添加し、次いでこれをパクリタキセルが溶解するまでボルテックスした。

次いで、パクリタキセル含有ミクロスフェアを基本的に上記工程（C）～（E）の様に生成し得る。

### 実施例29

#### 界面活性剤コーティングミクロスフェア

##### A. 材料および方法

ミクロスフェアを、ポリ(DL)乳酸（PLA）、ポリメチルメタタリレート（PMMA）、ポリカプロラクトン（PCL）およびエチレンビニルアセテート（EVA）：PLA（50:50）から、基本的に上記のように製造した。サイズは10~100 $\mu\text{m}$ の範囲であり、平均直径45 $\mu\text{m}$ を有した。

ヒト血液を健常なボランティアから得た。好中球（白血球）を、デキストラン沈降法およびFicoll Hypaque遠心分離技法を用いて、血液から分離した。好中球をHBSS 1mlあたり500万細胞で懸濁した。

好中球活性化レベルを化学発光により測定されるような活性酸素種の産生によ

って測定した。特に、1  $\mu$ Mルミノールエンサンスーを用いたLKB照度計を使用することによって化学発光を測定した。ミクロスフェアの血漿プレコーティング（またはオプソニン化）を、0.5mlの血漿中に10mgのミクロスフェアを懸濁し、そして37℃、30分間のタンブリングすることにより行った。

次いで、ミクロスフェアを1mlのHBBSで洗浄し、そして遠心分離したミクロスフェアペレットを好中球懸濁液に、37℃、時間  $t = 0$  で添加した。ミクロスフェア表面を、Pluronic F127 (BASF) と呼ばれる界面活性剤を用いて、F127の2 %w/wHBBS溶液0.5mlに10mgのミクロスフェアを、30分間37℃で懸濁することによって改変した。次いで、ミクロスフェアを、好中球にまたはさらにプレコーティングするために血漿に添加する前に、1mlのHBBSで2回洗浄した。

## B. 結果

図44は、未処理のミクロスフェアが50mV未満の化学発光値を生じることを示す。これらの値は低レベルの好中球の活性化を示す。比較のため、炎症性微結晶は1000mVに近い値を生じ得、可溶性化学アクチベーターは5000mVに近い値を生じ得る。しかしながら、ミクロスフェアを血漿でプレコーティングした場合、全ての化学発光値は100~300mVの範囲に増幅される（図44）。このレベルの好中球応答または活性化は、中程度に炎症性であると考えられ得る。PMMAは最も大きな応答を生じ、最も炎症性であると考えられ得た。PLAおよびPLCは両方とも、血漿前処理（またはオプソニン化）後、好中球の活性化において3~4倍より強力になったが、この点で、2つのポリマー間に差異はほとんどない。EVA:PLAは血管新生処方物に用いられる可能性はない。なぜならこのミクロスフェアは乾燥および水性緩衝液に再懸濁し難いからである。この血漿の効果はオプソニン作用と名付けられ、表面上への抗体もしくは補体分子の吸着に起因する。これらの吸着種は白血球上のレセプターと相互作用し、増幅された細胞活性化を引き起こす。

図45~48は、PCL、PMMA、PLAおよびEVA:PLAそれぞれの血漿プレコーティングの効果に記載し、そしてミクロスフェアの血漿プレコーティング前のPluronic F127プレコーティングの効果を示す。これらの図は全て、同様の効果を示す：（1）血漿プレコーティングは応答を増幅する；（2）Pluronic F127プレコーテ

イングはそれ自身に対する効果を有さない；（3）血漿プレコーティングにより引き起こされた増幅された好中球応答は、ミクロスフェア表面を2%Pluronic F127でプレコーティングすることにより強力に阻害され得る。

血漿由来の吸着されたタンパク質種の性質をまた、電気泳動により研究した。この方法を用いて、ポリマー表面をPluronic F127で前処理することが、抗体のポリマー表面への吸着を阻害することが示された。

図49～52は同様に、PCL、PMMA、PLAまたはEVA:PLAミクロスフェアを（それぞれ）、IgG（2mg/ml）または2%Pluronic F127次いでIgG（2mg/ml）でプレコーティングする効果を示す。これらの図から理解され得るように、ミクロスフェアをIgGでプレコーティングすることにより引き起こされる増幅された応答は、Pluronic F127での処理により阻害され得る。

この結果は、4つ全ての型のミクロスフェアのポリマー表面をPluronic F127でプレコーティングすることによって、ミクロスフェアに対する好中球の「炎症」応答は阻害され得ることを示す。

#### 実施例30

ポリ(E-カプロラクトン)ミクロスフェアへの治療薬のカプセル化。  
パクリタキセルを充填したミクロスフェアによるCAMアッセイにおける血管新生の阻害

本実施例は、ポリ(ε-カプロラクトン) (PCL) の生分解性ミクロスフェアからのパクリタキセルのインビトロ放出速度プロファイルを評価し、そしてCAM上に配置した場合のこれらのミクロスフェアから放出されるパクリタキセルのインビボ抗血管新生活性を示す。

これらの実験に利用した試薬には以下のものが挙げられる：PCL（分子量35,000～45,000；Polysciences (Warrington, PA) から購入）；Fisher Scientific Co., CanadaのDCM；Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis) のポリビニルアルコール (PVP)（分子量12,000～18,000、99%加水分解化）、およびSigma Chemical Co. (St. Louis, MO) のパクリタキセル。別に記述していなければ、全ての化学薬品および試薬を供給されたまま使用する。蒸留水を全てにわたり使用する

。

#### A. ミクロスフェアの調製

ミクロスフェアを溶媒エバポレーション法を用いて、実施例28に記載のように基本的に調製した。手短に言うと、5 %w/wパクリタキセルを充填したミクロスフェアを10mgのパクリタキセルおよび190mgのPCLを2 mlのDCMに溶解し、100mlの1 %PVP水溶液に添加し、そして1000rpmで、25℃ 2時間攪拌することにより調製した。ミクロスフェアの懸濁液を1000× gで10分間遠心分離し (Beckman GPR)、上清を除去し、そしてミクロスフェアを3回水で洗浄した。洗浄したミクロスフェアを一晩風乾し、室温で保存した。コントロールミクロスフェア (パクリタキセル非充填) を上記のように調製した。1 %および2 %パクリタキセル含有ミクロスフェアをまた調製した。ミクロスフェアを対物マイクロメーターを備えた光学顕微鏡を用いてサイズを測った。

#### B. カプセル化効率

既知の重量の薬物を充填したミクロスフェア (約5 mg) を8 mlのアセトニトリルに溶解し、そして2 mlの蒸留水を添加してポリマーを沈殿させた。混合物を1000 gで10分間遠心分離し、カプセル化されたパクリタキセル量をUV分光光度計 (Hewlett-Packard 8452Aダイオードアレイ分光光度計) で、232nmで測定した上情報の吸光度から計算した。

#### C. 薬物放出研究

約10mgのパクリタキセルを充填したミクロスフェアを、スクリーキャップしたチューブ中、20mlの10mM PBS (pH7.4) に懸濁した。チューブを37℃で所定の時間間隔で隔々まで振盪し、19.5mlの上清を除去し (ミクロスフェアを底に沈降させた後)、0.45 μmメンブランフィルターを通して濾過し、そしてパクリタキ

セル分析のため保持した。研究中ずっとシンク状態を保持するため、等容量のPBSを各チューブにおいて置換した。濾液を3 × 1 ml DCMで抽出し、DCM抽出物を窒素流動下でエバポレートして乾燥させ、1 mlのアセトニトリルに再溶解し、そして1 ml/分の流速 (Beckman Isocratic Pump) の水:メタノール:アセトニトリル (37:5:58) の移動相、C8逆相カラム (Beckman)、および232nmのUV検出器 (S

himadzu SPD A) を用いたHPLCによって分析した。

#### D. CAM研究

受精した家ニワトリ胚を、シェルレス培養前に4日間インキュベートした。インキュベーションの6日目、5%パクリタキセルを充填したまたはコントロール(パクリタキセル非充填)ミクロスフェアの1mgアリコートを経路CAM表面に直接置いた。2日曝露後、血管系を、ビデオカメラに接続した実体顕微鏡を用いて検査した；次いで、映像信号をコンピューター上に表示し、映像を印刷した。

#### E. 走査電子顕微鏡観察

ミクロスフェアをサンプルホルダーに入れ、金でスパッタリングコーティングし、次いで、15kVで作動するPhilips 501B SEMに配置した。

#### F. 結果

ミクロスフェアのサンプルのサイズ範囲は30~100  $\mu\text{m}$ であったが、全てのパクリタキセルを充填したまたはコントロールミクロスフェアバッチで、いくつかのミクロスフェアがこの範囲から外れていることは明らかであった。PCLミクロスフェアをパクリタキセルで充填する効率は、全ての薬物充填研究について、常に95%より大きかった。走査電子顕微鏡観察は、ミクロスフェアが全て球形であり、多くが粗いかまたはあばたのある表面形態を示すことを実証した。ミクロスフェアの表面上の固形薬物の証拠はないようであった。

1%、2%および5%充填PCLミクロスフェアからのパクリタキセル放出の経時変化を図53Aに示す。この放出速度プロファイルは二相性であった。全ての薬物充填において、パクリタキセルの初期急速放出または「バースト相」があった。

バースト相は、1%および2%パクリタキセル充填で1~2日にわたり、そして5%充填ミクロスフェアで3~4日にわたり生じた。急速放出の初期相に、有意により緩慢な薬物放出相が続いた。1%または2%パクリタキセル含有ミクロスフェアについては、21日後、さらなる薬物放出はなかった。5%パクリタキセル充填で、ミクロスフェアは、21日後、全薬物含有量の約20%を放出した。

図53BはコントロールPCLミクロスフェアで処理したCAMを示し、図53Cは5%パ

クリタキセルを充填したミクロスフェアでの処理を示す。コントロールミクロスフェアでのCAMは、正常な毛細血管網様構造を示した。パクリタキセル-PCLミクロスフェアで処理したCAMは、顕著な血管退行および毛細血管網を欠いている領域を示した。

#### G. 考察

パクリタキセルを充填したミクロスフェアを製造する溶媒エバポレーション法は、95～100%の間の非常に高いパクリタキセルカプセル化効率を生じた。これはパクリタキセルの低い水溶性、およびポリマー含有有機溶媒相をにおける分配を好むその疎水性の性質に起因した。

パクリタキセルの二相性放出プロファイルは、生分解性ポリマーマトリックスからの多くの薬物の放出パターンの典型であった。ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)は、生理的条件下で加水分解によって分解され得る脂肪族ポリエステルであり、そしてそれは非毒性およびそして組織適合性である。PCLの分解は、広範に研究された酪酸およびグリコール酸のポリマーおよびコポリマーの分解よりも有意に緩慢であり、それ故、長期薬物送達システムの設計に適している。パクリタキセル放出の初期急速相またはバースト相は、ミクロスフェアの表在領域（ミクロスフェア表面の近傍）からの薬物の拡散放出によると考えられた。放出プロファイルの第2（より緩慢な）相におけるパクリタキセルの放出は、PCLの分解または侵食に依らないようである。なぜなら、研究により、水中のインビトロ条件下では、7.5週間にわたるPCLの有意な重量損失または表面侵食は存在しないことが示されているからである。パクリタキセル放出のより緩慢な相はおそらく、ポリマーマトリックスの液体が充満した孔内の薬物の溶解および孔を介した拡散に依ったの

であろう。より高いパクリタキセル充填におけるより高い放出速度はおそらく、ポリマーマトリックス内のより広範囲な孔網の結果であったのであろう。

5%充填パクリタキセルミクロスフェアは、CAM上に配置した場合、血管新生の広範な阻害を産生するために十分な薬物を放出することが示された。血管増殖の阻害は、図53Cに示したような無血管性領域を生じた。

## 実施例31

## PLGAミクロスフェアの製造

ミクロスフェアを酪酸-グリコール酸コポリマー (PLGA) から製造した。

## A. 方法

ミクロスフェアを0.5~10 $\mu$ m、10~20 $\mu$ mおよび30~100 $\mu$ mのサイズ範囲で、標準的方法を用いて製造した (PCLまたはPDLLAミクロスフェア製造法に前記したように、ポリマーをジクロロメタンに溶解し、攪拌しつつポリビニルアルコール溶液に乳化した)。PLLA対GAの様々な比を、異なる分子量 (固有粘度 (I.V.) として示した) を有するポリマーとして用いた。

## B. 結果

ミクロスフェアを以下の出発ポリマーから首尾よく製造した：

PLLA	：	GA	I.V.
50	：	50	0.74
50	：	50	0.78
50	：	50	1.06
65	：	35	0.55
75	：	25	0.55
85	：	15	0.56

10%または20%充填のパクリタキセルを、これら全てのミクロスフェアに首尾

よく組み入れた。1つの出発ポリマー (85:15、IV=0.56) のサイズ分布の例を図54~57に示す。パクリタキセル放出実験を、様々なサイズおよび様々な組成のミクロスフェアを用いて行った。放出速度を図58~61に示す。

## 実施例32

## パクリタキセルのナイロンマイクロカプセルへのカプセル化

治療薬はまた、選択された形態またはデバイスに形成され得る広範なキャリア中にカプセル化され得る。例えば、以下により詳細に記載するように、パクリタキセルは、人工心臓弁、血管移植片、外科手術用メッシュ、または縫合糸に処方され得るナイロンマイクロカプセル中に組み込まれ得る。



#### A. パクリタキセルを充填したマイクロカプセルの調製

パクリタキセルを、界面重合化技術を用いて、ナイロンマイクロカプセル中にカプセル化した。簡潔には、100mgのパクリタキセルおよび100mgのPluronic F-127を1mlのDCM中に溶解させ、そして0.4ml（約500mg）のアジポイルクロリド（ADC）を添加した。この溶液を、Polytronホモジナイザー（設定1）を用いて、15秒間にわたり、2%PVA溶液中にホモジナイズした。ホモジナイズの間、5ml蒸留水中の1,6-ヘキサンジアミン（HMD）の溶液を滴下した。HMD溶液の添加後、さらに10秒間、この混合物をホモジナイズした。この混合物をビーカーに移し、そしてマグネチックスターラーで3時間にわたって攪拌した。この混合物を遠心分離し、回収し、そして1mlの蒸留水中に再懸濁させた。

#### B. カプセル化効率／パクリタキセルローディング

約0.5mlの懸濁液を濾過し、そしてミクロスフェアを乾燥させた。約2.5mgのマイクロカプセルを秤量し、そして10mlのアセトニトリル中に、24時間にわたって懸濁させた。上清をパクリタキセルについて分析し、そして結果をパクリタキセルの百分率として表した。予備的研究は、パクリタキセルが、高いローディング

（60%まで）および高いカプセル化効率（80%を越える）で、ナイロンマイクロカプセル中にカプセル化され得たことを示している。

#### C. パクリタキセル放出の研究

約2.5mgのパクリタキセル－ナイロンミクロスフェアを、それぞれ1Mの塩化ナトリウムおよび尿素を含む50mlの水中に懸濁させ、そして定期的に分析した。マイクロカプセルからのパクリタキセルの放出は速く、72時間後、95%を越える薬物が放出された（図62）。

### 実施例33

#### 生体接着性ミクロスフェア

##### A. 生体接着性ミクロスフェアの調製

ミクロスフェアを、 $10\mu\text{m}$ ～ $60\mu\text{m}$ の粒子直径範囲を有するPLLA 100kg/molから調製した。ミクロスフェアを、水酸化ナトリウム溶液中でインキュベートして、ポリエステルの加水分解により、表面上にカルボン酸基を生成させた。表面の電

荷を測定することにより、水酸化ナトリウム濃度およびインキュベーション時間について、反応をキャラクタライズした。反応は、0.1M水酸化ナトリウム中での45分のインキュベーションの後、完結に達した。塩基処理の後、ミクロスフェアをジメチルアミノプロピル (proyl) カルボジイミド (DEC) (架橋剤) のアルコール性溶液に懸濁させ、そして混合物を乾燥させて分散可能な粉末にすることにより、ミクロスフェアを、DECでコーティングした。ミクロスフェアとDECの重量比は、9 : 1であった。ミクロスフェアが乾燥した後、これらを攪拌しながら、ポリ (アクリル酸) (PAA) の2 %w/v溶液中に分散させ、そしてDECをPAAと反応させて、ミクロスフェア表面上に、水不溶性の架橋PAA網目を生成させた。ミクロスフェア表面上のPAAの存在を確認するために、走査電子顕微鏡を用いた。

塩基での処理前および処理後における、ミクロスフェアの示差走査熱量分析は、バルク熱 (bulk thermal) 特性 ( $T_g$ 、融解、および結晶化度) における変化がなかったことがSEMによって観察されたことを明らかにした。

#### B. インビトロでのパクリタキセル放出速度

同じ粒子直径サイズ範囲を有する、パクリタキセルを充填したミクロスフェア (10%および30%w/wのローディング) を製造し、そしてPBS中10日にわたる放出におけるインビトロ放出プロフィールを作成した。放出は、薬物ローディングに比例し、10日の間、30%充填ミクロスフェアの5 mgから放出されたパクリタキセルは400  $\mu$ gであり、そして同様の期間中、10%充填ミクロスフェアから放出されたパクリタキセルは150  $\mu$ gであった。カプセル化の効率は、約80%であった。パクリタキセルを充填したミクロスフェアを、0.1Mの水酸化ナトリウム中で45分間にわたってインキュベートし、そして水酸化ナトリウム中でのインキュベーションの前後で、ゼータポテンシャルを測定した。パクリタキセルを充填したミクロスフェアの表面電荷は、塩基による処理の前後の両方で、パクリタキセルを有しないミクロスフェアよりも低かった。

#### C. ポリリジンまたはフィブロネクチンのいずれかでコーティングされたPLLAの調製およびインビトロでの評価

1 %スーダンプラック (sudan black) を含む (ミクロスフェアを着色するた

め) PLLAミクロスフェアを調製した。これらのスフェアを、ポリリジン (Sigma chemicals-ヒドロプロメル形態 (Hydrobromell form)) またはフィブロネクチン (Sigma) のいずれかの2% (w/体積) 溶液中に、10分間にわたって懸濁させた。このミクロスフェアを、緩衝液中で1回洗浄し、そして新たに準備したラットの膀胱の内部表面に配置した。膀胱を10分間放置し、次いで緩衝液中で3回洗浄した。このプロセス後、膀胱壁に存在している残存 (結合) したミクロスフェア (従って、生体接着を示すミクロスフェア) は、フィブロネクチンをコーティングしたミクロスフェアおよびポリ-L-リジンをコーティングしたミクロスフェアの両方について、生じた (図63A および63B)。

#### 実施例34

CIAラットモデルにおける、パクリタキセルによる関節炎発症の防止

##### A. 材料および方法

同系の雌性Louvainラット (体重120~150グラム) に、0.1M酢酸で可溶化しそしてFIA (Difco, Detroit, MI) で乳化した、0.5mgの天然のチック (chick) コラーゲンII (Genzyme, Boston, MA) を皮内注射した。免疫処置のほぼ9日後、動物は、パンス形成および骨/軟骨侵食の組織学的変化を伴う多発性関節炎を発現した。4つのプロトコル (ビヒクルを単独で受容したコントロール群 (n=17)、ならびに1つの防止プロトコルおよび2つの抑制プロトコルからなる、3つのパクリタキセル処置群) 中、計45匹のラットが用いられた。パクリタキセルの効果を評価するために、パクリタキセル (エタノールとCremophor E.L. (登録商標) (Sigma) との1:1希釈物中で可溶化し、生理食塩水に添加して、5%w/vエタノールおよびCremophor E.L.中のパクリタキセルの最終濃度を4.8mg/mlにした) を、そして免疫処置後第2日目 (防止プロトコル) または第9日目の関節炎発症時 (抑制プロトコル) に、腹腔内 (i.p.) 投与を開始した。防止プロトコル (n=8) については、パクリタキセルを、1mg/kg体重の濃度で、第2日目から開始して、その後の5回の投与 (第5日目、第7日目、第9日目、第12日目、および第14日目) により与えた。高用量の抑制プロトコル (n=10) については、パクリタキセル (1mg/kg体重) を、第9日目から開始して1日おきに与えた。低用量

の抑制プロトコル (n=10) では、パクリタキセルを、1mg/kg体重で、第9日目、第11日目、および第13日目に与え、次いでこの用量レベルの75% (0.75mg/kg体重) を、1日おきに、第21日目まで与えた。コントロール動物および実験動物を、疾患の重篤度について、処置群を知らされていない (blinded to) 個人によって、臨床的におよびX線写真により評価した。

各肢についての炎症の重篤度を、日毎に評価し、そして腫脹および関節周囲の紅斑の標準化されたレベル (0は正常であり、4は重篤である) に基づいて評定した。動物を、実験の第28日目に、X線写真により評価した。両方の後肢のX線写真を、軟組織の腫脹、関節の間隙の狭さ、骨の破壊、および骨膜の新骨形成の程度によりランク付けした。各肢を数量化するために、0～3のスケールを用いた (0 = 正常、1 = 軟組織腫脹、2 = 骨の初期侵食、3 = 重篤な骨の破壊およ

び/または強直症)。関節の組織学的評価を、この実験の終わりに完結させた。

CIIに対する、遅延型過敏症 (DTH) を、第28日目に完結した放射線耳アッセイ (radiometric ear assay) により測定した。1.4以上の放射線耳指数 (radiometric ear index) は、CIIへの顕著な応答を表す。抗-CII IgG抗体の存在は、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により測定された。第26日目に得られた血清サンプルを、1 : 2560に希釈し、そして結果を、490nmにおける平均光学密度 (4連のアリコート中) として表した。この希釈率での正常なラット血清中のバックグラウンドレベルは0であり、そしてこれらは、コラーゲンで免疫処置したラット血清から容易に識別可能である。

## B. 結果

このモデルにおいて、関節炎発症の前に実施されたパクリタキセル処置は、ビヒクルコントロール群と比較すると、全ての処置されたラットにおいて (パクリタキセル処置を中断した後でさえも)、疾患の発現を完全に防止した。

コントロール動物において、疾患の臨床的症状は、変形および関節機能の喪失が起こるまで漸進的に増加した。関節炎の発症後、低用量および高用量のパクリタキセルを受容した動物は共に、顕著な臨床的改善を示した。平均して、臨床的評点は、処置の開始時に見られた評点と同等であり、このことはパクリタキセル

が疾患の臨床的進行を防止する能力を示した。

パクリタキセルを受容した動物は、体重を支えること (weight bear) ができ、歩行可能であり、そして仮に処置に何らかの毒性効果があるとしても、それらを少しも示さなかった。処置された動物において、ワクチン接種部位における創傷治癒および体毛再成長が観察された。パクリタキセルで処置した動物は、コントロールと比較して、体重が増加した。

パクリタキセル関節炎防止プロトコルにおけるラットはいずれも、いかなるX線写真での変化も、臨床的関節炎も表さなかった。高用量および低用量のパクリタキセルの群の両方とも、コントロール群と比較して、X線写真で観察される疾患が顕著に少なかった。さらに、組織学的評価により、コントロール群のラットは顕著なパヌス（骨および軟骨の侵食を伴う）を示したが、パクリタキセルで

処理したラットは、たとえパヌスを有しても最小限であり、関節の軟骨が保護されたことが明らかになった。

ELISAアッセイを用いると、II型コラーゲンに対するIgG抗体は、コントロール群と比較して、パクリタキセルで処理したラットにおいて顕著に低かった；防止プロトコルにおけるラットは、高用量および低用量のパクリタキセル投与抑制プロトコルにおけるラットと比較して、顕著に低いIgG抗体を有した。

### C. 考察

パクリタキセルは、関節炎およびおそらくは他のタイプの自己免疫疾患のための実行可能な処置である。なぜなら、これは、免疫処置の後であるが関節炎の発症の前に投与される場合、疾患のプロセスを遮断するからである。この結果は、パクリタキセルが、CII免疫処置の2日後に開始された場合、関節炎発症を完全に抑止し得ることを示す。抑制プロトコルにおけるパクリタキセル処置に関して、関節炎の重篤性は、パクリタキセル投与の期間中減少し続けたが、両方の抑制プロトコルにおいて、処置を中止した後4日以内に増加し始めた。しかし、パクリタキセルを用いる早期介入により、連続的な治療の必要性が緩和されるようであった。

## パクリタキセルを用いる、コラーゲン誘発関節炎の後退

パクリタキセルは、ミセル製剤中で全身投与される場合、CIAモデルにおける疾患改変効果 (disease-modifying effect) を示した。パクリタキセルの潜在的な疾患改変効果を評価するために、ミセル性 (Cremophorを有さない) パクリタキセルを、4日毎に (q.o.d.)、5mg/kg (第1群) または10mg/kg (第2群) で、臨床的に検出可能な関節炎の発症時 (第9日目) に、免疫処置した動物に腹腔内 (i.p.) 投与した。評価期間を通して、パクリタキセルを投与した。標準的治療との比較として、第3の群は、関節炎の発症後第0日目、第5日目、および第10日目に、0.3mg/kg (i.p.) (ヒト等価用量) で、メトトレキセートを受容した。

第4の群は、メトトレキセート (0.3mg/kg) およびミセル性パクリタキセル (10mg/kg) の組み合わせ治療を受けた。コントロール (第5群) および実験動物を、処置群について知らされていない個人によって、臨床的およびX線写真の両方により、疾患の重篤性について評価した。

各肢についての炎症の重篤度を、日毎に評価し、そして腫脹および関節周囲の紅斑の標準化されたレベル (0は正常であり、4は重篤である) に基づいて評定した。動物を、実験の第28日目に、X線写真により評価した。両方の後肢のX線写真を、軟組織の腫脹、関節の間隙の狭さ、骨の破壊、および骨膜の新骨形成の程度によりランク付けした。各後肢を数量化するために、0～3のスケールを用いた (0 = 正常、1 = 軟組織腫脹、2 = 骨の初期侵食、3 = 重篤な骨の破壊および/または強直症) (Brahmら、Arthritis Rheum. 37:839-845, 1994; Oliverら、Cell. Immunol. 157:291-299, 1994)。関節の組織学的評価を、この実験の終わりに完結させた。

このモデルにおいて、関節炎発症の前に実施されたミセル性パクリタキセル処置は、パクリタキセル処置を中断した後でさえも、疾患の発現を完全に防止した。コントロール動物において、疾患の臨床的症状 (図64) は、変形および関節機能の喪失が起こるまで漸進的に増加した。メトトレキセート治療を受容した動物は、コントロールと比較して、統計的に改善されなかった (図64および表1)。

関節炎の発症後、低用量ミセル性パクリタキセル（5 mg/kg）を受容した動物は、幾分か改善を示したが、10mg/kgの用量のミセル性パクリタキセルを受容した動物は、高度に有意な（ $p=0.0002$ ）臨床的改善を示した（図64）。平均して、臨床的評点は、処置の開始時において見られた評点と同等であり、ミセル性パクリタキセルが疾患の臨床的進行を防止する能力を示した（表1）。

表 1

ミセル性パクリタキセルは、コラーゲン誘発関節炎ラットモデルにおいて  
臨床的指数を改善する

	第10日目における 関節炎指数	最大平均 関節炎評点	コラーゲン誘発に 対する抗体
関節炎コントロール (n=11)	$6.1 \pm 0.6$	$6.4 \pm 0.5$	$0.199 \pm 0.0042$
メトトレキセート (0.3 mg/kg) (n=5)	$5.4 \pm 0.6$ (p = NS)	$5.7 \pm 0.6$ (p = NS)	$0.182 \pm 0.0034$ (p < 0.003)
ミセル性パクリタキセル (5 mg/kg) (n=4)	$4.3 \pm 1.8$ (p = NS)	$4.3 \pm 1.8$ (p = NS)	$0.176 \pm 0.0042$ (p < 0.01)
ミセル性パクリタキセル (10 mg/kg) (n=5)	$2.0 \pm 0.7$ (p = 0.0002)	$3.8 \pm 0.7$ (p = 0.0002)	$0.162 \pm 0.0194$ (p < 0.02)
ミセル性パクリタキセル (10 mg/kg)/ メトトレキセート (0.3 mg/kg) 併用 (n=7)	$1.1 \pm 0.5$ (p = 0.0001)	$3.6 \pm 0.9$ (p = 0.0001)	$0.164 \pm 0.0090$ (p < 0.001)

・ 関節炎指数は、腫脹および関節周囲の紅斑のレベルを数量化した。0は正常を表し、そして4は重篤であることを表し、そして最大のとり得る評点は、後肢の総和で8である。t検定は、薬物処置したラットと、コントロールのコラーゲン誘発関節炎ラットとを、関節炎発症から第10日目において比較した。

・ パクリタキセル処置した動物の臨床的評点は、コントロール動物よりも有意に低く、かつ、処置の開始時に見られた評点と同等であり、疾患の進行を阻止する能力を示した。

・ NS=有意ではない。

ミセル性パクリタキセルを受容した動物は、体重を支えることができ、歩行可能であり、そして処置のいかなる毒性の影響も示さなかった。処置された動物において、ワクチン接種部位における創傷治癒および体毛再成長が観察された。ミセル性パクリタキセル処置動物は、非処置コントロールと比較して、体重が増加

した。ミセル性パクリタキセルおよびメトトレキセートを受容した動物は共に、コントロールと比較して、治療に良好に耐え、そして印象的な臨床的改善を示した ( $p \leq 0.0001$ ) (図64)。酵素結合免疫吸着抗体 (ELISA) アッセイを用いると、

II型コラーゲンに対するIgG抗体は、パクリタキセルおよび組み合わせ (MTX/パクリタキセル) で処置されたラットにおいて、コントロールと比較して低かった。

X線写真の研究はまた、パクリタキセル治療について顕著な改善を示した。コントロール動物およびメトトレキセートで処置した動物は、軟組織の腫脹、関節の間隙が狭くなっていること、骨破壊、および骨膜の新骨形成のX線写真による証拠を示したが、パクリタキセルで処置した動物は、X線上で、ほぼ正常な関節の形状を有した (図65)。

実際に、ミセル性パクリタキセル単独 (10mg/kg) またはメトトレキセートとの組み合わせを受容した動物のうち、軟骨の侵食を発現したのはごく小さい割合 (17~18%) の動物であった。疾患の進行/結果の重要な指標である軟骨の侵食は、ミセル性パクリタキセル治療を受容する動物と比較して、コントロール動物 (72%) またはメトトレキセートを単独で受容する動物では、4倍起こりやすい (表2)。

表2

ミセル性パクリタキセルは、コラーゲン誘発関節炎ラットモデルにおいて  
X線写真指数を改善する

	侵食を有する 動物の百分率	X線写真 平均点
関節炎コントロール (n=22)	72%	4.31 ± 0.45
メトトレキセート (0.3 mg/kg) (n=17)	76% (p = NS)	4.25 ± 0.64 (p = NS)
ミセル性パクリタキセル (5 mg/kg) (n=9)	50% (p = NS)	3.25 ± 1.60 (p = NS)
ミセル性パクリタキセル (10 mg/kg) (n=16)	17% (p = 0.0005)	1.78 ± 0.60 (p < 0.0001)
ミセル性パクリタキセル (10 mg/kg)/ メトトレキセート (0.3 mg/kg) の組み合わせ (n=22)	18% (p = 0.0003)	1.45 ± 0.38 (p < 0.0001)



・コラーゲン誘発関節炎 (CIA) ラットの両方の後肢のX線写真は、軟組織の腫脹、関節の間隙が狭くなっていること、骨破壊、および骨膜の新骨形成の程度によりランク付けされた。0～3の整数スケールを用いて、各肢を数量化した（両方の肢の和からの、最大のとり得る評点は6である）。

・疾患の進行／結果の重要な指標である軟骨侵食の存在は、ミセル性パクリタキセル治療を受容する動物（18％）と比較して、コントロール動物では、4倍起こりやすい（72％）。

走査型電子顕微鏡写真は、インビボにおけるパクリタキセル治療の軟骨保護効果を明らかにする。正常な関節表面は、薄い骨膜内層によって囲まれた、滑らかな無傷の軟骨マトリックスにより特徴付けられる（A）。CIAにおいて、軟骨表面はパンプス組織により産生されたMMP、および炎症を起こした骨膜で侵食されている（図66B）。浅在性軟骨マトリックスは消化され、軟骨細胞またはかつては軟骨細胞が占めていた空小腔を曝す（図66B挿入図）。臨床関節炎の発症後にパクリタキセル処置を受けた、CIAを有する動物では、関節表面は無傷のままであり（図66C）、そして軟骨マトリックスは、高倍率でさえ大部分が正常なようであった（図66C挿入図）。パンプス組織形成、および骨膜肥大はパクリタキセル処置群においては見られなかった。

組織学的には、CIAは、顕著な骨膜肥大、骨膜の炎症性細胞浸潤、および軟骨破壊によって特徴付けられる（図67A）。パクリタキセル処置動物においては、骨膜は1～2層の骨膜細胞のみを有して正常であるように見え、炎症細胞浸潤は観察されなかった（図67B）。

また、腐食鑄造物を、パクリタキセルがCIAを有する動物の骨における新血管形成をブロックし得るかを決定するために評価した。メルコックス（mercox）ポリマーを、屠殺した動物の大腿動脈に100mmHgの圧力で注入し、インサイチュで固化させ、続いて、組織を消化して、下肢血管系の鑄造物を作った。CIAを有する動物の骨膜血管系の鑄造物の走査電子顕微鏡写真により、関節空間に向かう内向きに突出した末端部が判別不可能な（blind-ended）毛細血管新芽が明らかになった。これらの血管は、固形腫瘍および他の血管形成形態で記載される成長中

の血管形成性血管に形態学的に類似するようであった（図68A挿入図）。対照的に、パクリタキセル処置動物の骨膜血管は、毛細血管ループに配置され（図68B）、血管新生芽の証拠はなかった。

投薬を受けていないコントロールに見出されるものと同じく、パクリタキセル／MTXレシピエントにおいて、血管増殖の退行および形態学的な血管構造が存在した。これらの研究は、ミセルのパクリタキセル、およびパクリタキセル／メトトレキセート組合せ治療が、新生血管形成を退行させ、炎症プロセスを阻害し、定着した骨膜炎を退縮させ、そして関節破壊を防止し得ることを示唆する。

パクリタキセルの全身投与は、関節炎に対する実行可能な治療であることが示された。疾患の本来の過程は、発赤および軽減であり、連続する発赤のそれぞれが、加算的な損傷を生じ、最終的に関節の破壊を導く。疾患の緩解傾向を導くために用いられる、短期的で高容量の全身治療、または疾患制御を維持するための、持続的低容量治療の可能性が存在する。パクリタキセルを送達する他の方法には、1ヶ所または2ヶ所の顕著な関節疾患を有する患者の罹患関節への薬物の直接的な関節内注射が挙げられる。

### 実施例36

#### 乾癬の動物モデルにおけるパクリタキセル処方物の評価

##### A. 皮膚血管形成モデル

皮膚特異的血管形成を研究するため、新規の動物モデルを用いた。免疫不全SCIDマウスを、センス方向、またはアンチセンス方向で血管内皮増殖因子（VEGF）をトランスフェクトしたヒトケラチノサイト株の表面移植物のレシピエントとして、用いる。ケラチノサイトを、改変型シリコーン移植チャンバーアッセイの使用を介してレシピエントマウスの皮膚上に移植する。ケラチノサイトを、分化させ、そして皮膚血管形成を誘導させる。次いでパクリタキセルを全身、または局所的（クリーム、軟膏、ローション、ゲル）に投与し、そして処置群および非処置群において、血管数およびサイズの形態計測的測定を行う。

##### B. 皮膚遅延型過敏反応に対するマウスモデル

皮膚遅延型過敏反応に対するマウスモデルを用いて、誘導性皮膚炎症に対する

パクリタキセルの効果を研究した。簡潔には、皮膚上にオキサゾロン(oxazolone)を局所的に適用することにより、マウスをこの化合物に感作させた。5日後、耳の皮膚に局所的に適用することでマウスをオキサゾロンで攻撃し(左耳:オキサゾロン、右耳:ビヒクル単独)、皮膚炎症性の「遅延型過敏」反応を起こした。炎症の程度を、48時間にわたって、生じた耳の腫脹を測定することにより数値化した(図69および70を参照のこと)。Eponに包埋し、Giesmaで染色した $1\mu\text{m}$ 組織切片を、炎症細胞の存在、組織肥満脂肪の存在およびその活性化の状態、ならびに上皮過形成の程度について評価した。このインビボモデルにおける、皮膚炎症反応に対するパクリタキセルの効果を定量化するため、全身または局所的のいずれかでパクリタキセルを投与した。

### C. 結果

これらの研究は、マウスにおいて実験的に誘導した皮膚炎症の処置における1%パクリタキセルの局所投与と、ビヒクル単独の局所投与との比較は、パクリタキセルが皮膚炎症に阻害効果を及ぼすことを示した。実験的に誘導した遅延型過敏反応において、ビヒクル単独で局所的に処置した耳と比較して、1%パクリタキセルで局所的に処置した耳の耳腫脹に有意な減少が存在した。1%パクリタキセル処方物の局所的適用は、PMA(ホルボル12-ミリストール13-アセテート)の局所適用によって誘導された、耳の腫脹および紅斑(発赤)を有意に阻害した(図71および図72を参照のこと)。図73に例示したように、パクリタキセルで処置した耳(右耳)は、コントロール(左耳)と比較して外見上は正常であった。計5匹のマウスで類似の結果が得られた。

1%パクリタキセルの皮膚刺激を、ビヒクル単独と比較して評価するために、これらの2つの処方物の適用を8日間にわたって、両耳の各側にそれぞれ、毎日 $20\mu\text{l}$ 適用した。8日後、正常または炎症の起きたマウス耳皮膚へのビヒクル単独、および1%パクリタキセル処方物いずれの適用後も、皮膚刺激は検出されなかった。

### 実施例37

#### 動物モデルにおける慢性拒絶の評価

促進型のアテローム性動脈硬化症が、心臓移植レシピエントの大部分で進展し、長期の移植片の生存を制限する。慢性拒絶のLewis-F344異所性ラット心臓移植モデルは有用な実験モデルである。なぜなら、これは、アテローム性動脈硬化症の病変を、中期および長期生存同種移植片において段階的に産生するからである。Lewis-F344モデルの利点は：(i)長期生存移植片における、アテローム性動脈硬化症の病変の発生率および重篤度が極めて高く；そして(ii)この系は免疫抑制を必要としないので、病変進展の炎症段階が容易に認識されるということである。

成体雄性Lewisラットはドナーとして供され、そしてF-344ラットはレシピエントとして供される。麻酔したレシピエントにおいて腹部に長い正中切開を行い、大動脈および下大静脈を露出させることによって、20の異所性腹部心臓同種移植片を移植した。2つの血管を、互いに分離し、そして周囲の結合組織から分離し、血管上に小さい留め具を付ける。各血管に吻合部位で縦方向の切開（2 mm～3 mm）を行う。

麻酔されたドナーラットの腹部を、下大静脈内に300ユニットの水性ヘパリンを注入するために切開する。胸壁を心臓が露出するように切開する。大静脈を結紮し、次いで上大動脈および主肺動脈を切除し、2～3 mmの長さで残った血管起点を心臓に接続する。結紮に対して遠位側の大静脈を分割し、そして結紮を左心房および肺静脈の集団のまわりに配置する。結紮の肺側の血管を分割し、そして心臓を除去する。

ドナー心臓をレシピエントの腹腔内に配置し、そして大動脈をレシピエントの血管の切開部位と一緒に縫合する。同様に、肺動脈を下大静脈の切開部位に同様の様式で接続する。血管クランプを放し（近位大静脈、遠位静脈および動脈、ならびに近位大静脈）、針穴からの出血を最小限にする。

移植後、ポリカプロラクトン(PCL)ペースト(n=10)中のパクリタギセル(33%)またはPCLペースト単独(n=10)を10匹のラットの冠状動脈の外側表面の長さにわ

たって心外膜を通じて注射し、その結果心筋に包埋された動脈領域が未処置のまま残る。

全てのレシピエントは、移植時にペニシリンG (100,000ユニット)の単回筋肉内注射を受ける。同種移植に次いで日々の触診を行い、そして1～4のスケールで(4が通常の心拍を表し、そして0が機械的活動の欠如を表す)それらの機能を評価する。各グループからの5匹のラットを14日間で屠殺し、残りの5匹のラットも28日間で屠殺する。ラットを重量の減少および他の全身性疾病の徴候に関して観察する。14または28日後、動物を麻酔し、そして最初の実験の様式で心臓を露出させる。被覆されたおよび被覆されていない冠状動脈を単離し、10%緩衝化ホルムアルデヒドで固定化し、そして組織学的に検査する。

最初の実験は、移植後の冠状動脈でのパクリタキセル/EVAフィルムまたは被覆されたステントの使用のために改変され得る。EVAフィルムは、被覆されたステントを管腔内に設置しながら、冠状動脈の管腔外表面に上記と同様の様式で適用される。

さらに、これらの調査は他の組織移植ならびに移植片移植(例えば、静脈、皮膚)を含むようにさらに拡張され得る。

### 実施例38

#### MSの動物モデルにおけるパクリタキセルの効果

脱髄性トランスジェニックマウスのMS症状の進行および病原性を阻害するパクリタキセルミセルの能力(Mastronardiら、J. Neurosci. Res. 36:315-324、1993)は検査された。これらのトランスジェニックマウスは、70コピーのトランスジェンDM20(ミエリンプロテオリピド)含む。臨床的に、動物は3月齢まで通常である。3ヶ月後、神経学的病理の証拠(例えば、発作、震え、後肢可動性(hind limb mobility)、歩行不安定、びっこ引き(limp tail)、ゆらぎ歩行および活動性の程度の減少)が明らかであり、そして動物が6月齢と8月齢との間で死ぬまで重症度が進行的に増大する。臨床的な徴候は、脳内の脱髄および増加した線維性星状細胞増殖と組織学的に相関する(Mastronardiら、J. Neurosci. Res. 36:315-324、1993)。

#### A. 材料および方法

2つの動物研究を、低容量継続治療パクリタキセルプロトコール(2.0mg/kg；

1週間当たり3回、合計10回の注射)または疾患の臨床的発症で開始される高用量「パルス」治療パクリタキセルプロトコール(20mg/kg; 4回、1週間に1度)のいずれかの皮下投与を用いて実施された(約4月齢)。低容量プロトコールに関して、5匹の動物がミセルパクリタキセルを受け、2匹のマウスをコントロールとして用いた; 1方のマウスは未処置の正常であり、そしてもう一方は未処置のトランスジェニック同腹仔であった。疾患の過程が研究室内で十分に確立されるので、1方のマウスのみがコントロールとして使用された。MSの最初の徴候が上記の症状カテゴリーの1+のスコアに達した後、4月齢の動物をミセルパクリタキセルで注射した。処置の過程は、24日間であった(2.0mg/kgパクリタキセル、1週間当たり3回、10回用量)。体重および臨床的徴候を各注射の日に決定した。

## B. 結果

パクリタキセルを受けた5匹の動物は、顕著な体重減少を示さなかった。しかし、未処置のトランスジェニックマウスは30%の体重減少(29gから22g(図74))を示し、疾患の進行に正常に関連している。

MSの臨床的指標(例えば、震え、後肢可動性、発作、頭部震動、歩行不安定、ゆらぎ歩行および活動性の程度の減少)は、日々モニターされた。処置の開始において、動物は主な症状カテゴリーの1+のスコアを有した。未処置の動物は、多くの症状において次の27日間にわたって1+から4+へスコアが進行した; 3+は貧弱な平衡感覚で特徴づけられ、疾患の主な特徴の1つである。パクリタキセル処置グループにおいて、全5匹の動物はモニターされた症状の全てにおいて同じ期間にわたって1+のスコアのままであった(表1)。

表 1 トランスジェニックマウスの多発性硬化症症状の進行における 低容量継続パクリタキセルの効果						
マウス	年齢 (月)	発作	震え	後肢麻痺	頭部震動	減少重量 (%)
トランスジェニック動物(未処置)	3	1 +	1 +	1 +	1 +	0
	6	2 + ~ 3 +	2 + ~ 3 +	2 + ~ 4 +	3 +	30%
トランスジェニック動物(パクリタキセル処置)	3	1 +	1 +	1 +	1 +	0
	6	1 +	1 +	1 +	1 +	5 ~ 10%
コントロール動物(パクリタキセル処置)	3	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0 ~ 5%
・未処置トランスジェニック動物は、27日間にわたって重篤な症状の進行を有し、一方パクリタキセル処置動物は、同じ期間にわたって最小神経学的症状を有した。 ・スコア1 + は、最小徴候以外の限定された意味を有する；4 + は、瀕死状態である。						

高用量プロトコールに関して、マウスは腫瘍患者に使用されるように(乳ガンおよび卵巣ガンに関して月々与えられる)疑似間隔パルス化学療法に4週間の間、20mg/kgのパクリタキセルで週に1度処置された。動物を10週間、2日おきにモニターし、そしてスコアを各症状ごとに決定した。3匹の未処置の動物において、実験の過程の間に神経学的症状が急速に進行し、そしてそれらの動物のうち2匹が(5週間および9週間で)死亡した；第3の生き残っている動物は、重篤な臨床的症狀を有した。症状の発症後に開始されたパクリタキセル処置を受けている5匹のトランスジェニック動物において、モニターした最初の1週間後、コントロールに対してMSスコアの減少があり、そしてその後、さらなる神経学的悪化

は観察されなかった。これらの動物において、疾患の進行は、観察されず、そして動物は治療の間(0~3週間)および薬物処置の中止の後(4~10週間)の両方で

臨床的に緩解のままである(図75)。

### C. 結論

パクリタキセルは、低容量および高用量でのMSのこの動物モデルにおいて観察された神経学的症状の急速な進行を防止した。これらのデータは、パクリタキセルが脱髄疾患の強力な治療剤であり得ることを示唆する。

### 実施例39

鼻ポリープの処置のためのパクリタキセルおよび他の微小管安定剤の評価

上皮細胞培養物および/または鼻ポリープ組織培養物は、鼻ポリープの処置におけるパクリタキセルまたは他の薬剤を含む処方物の効力を評価するために使用される。このアプローチは、上皮細胞がサイトカインを放出し、そして鼻ポリープ症および鼻炎ならびに喘息で検出される慢性的な炎症に寄与すること、および延長された放出投薬が、好酸球増加症を予防し、サイトカイン遺伝子発現を阻害するという前述の事項に基づいている。

鼻スプレーとして使用するための粘膜接着性ポリマー中にカプセル化されたパクリタキセルを含有する溶液(シクロデキストリンの使用)または懸濁液を含むパクリタキセル処方物、および/または粘膜接着性ポリマー中のマイクロカプセル化パクリタキセルは、ガス注入として使用される。これらの処方物は以下に詳述された研究に使用される。

### A. インビトロでのパクリタキセルの効果

組織の取り扱い—正常鼻粘膜(NM)標本を、鼻炎の臨床的な証拠がなく、そして鼻再建手術中に肌刺しテスト(skin-prick test)で陰性である患者から得る。鼻ポリープ(NP)標本を鼻ポリープ切除を施した肌刺しテスト(skin-prick test)で陽性および陰性である患者から得る。鼻の標本は、100UI/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシンおよび2  $\mu$ g/mlアンホテリシンBを補充したHam's F12培

地に設置され、そして直ちに研究室に移される。

上皮細胞培養物—NMおよびNPからの鼻上皮細胞を、以下のようにプロテアーゼ消化によって単離する。組織標本を100UI/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシンおよび2  $\mu$ g/mlアンホテリシンBを補充したHam's F12で2～3回リン



スし、次いでHam's F12中の0.1%プロテアーゼXIV型で4℃で一晩インキュベートする。インキュベートの後、10%FBSをプロテアーゼ活性を中和するために添加し、そして上皮細胞を穏やかな攪拌により剥離する。細胞懸濁液を60メッシュ細胞解離シーブでろ過し、そして500gで10分間室温で遠心する。次いで細胞ペレットを、以下の試薬を含むホルモン規定Ham's F12培地(Ham's HD)に再懸濁する：100UI/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシン、2  $\mu$ g/mlアンホテリシンB、150  $\mu$ g/mlグルタミン、5  $\mu$ g/mlトランスフェリン、5  $\mu$ g/mlインスリン、25ng/ml上皮成長因子、15  $\mu$ g/ml内皮細胞成長補充物、200pMトリヨードチロニン(triiodothyronine)および100nMヒドロコルチゾン。次いで、細胞懸濁液(10<sup>5</sup>細胞/ウェル)を2mlのHam's HD中にコラーゲンコーティングされたウェルにプレートし、そして5%CO<sub>2</sub>加湿雰囲気中で37℃で培養する。培地を1日で、次いで1日おきに交換する。単層細胞コンフルエンスは培養6～10日後に達成される。

ヒト上皮条件培地(HECM)生成—上皮細胞培養物がコンフルエンスに達した場合、Ham's HDを、100UI/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシン、2  $\mu$ g/mlアンホテリシンB、150  $\mu$ g/mlグルタミンおよび25mM Hepes緩衝液で補充されたRPMI1640培地(Irvin, Scotland)に切り替える(RPMI 10%)。RPMI(10%)とのインキュベートの48時間後に生じるHECMを培養物から収集し、室温(RT)で10分間400gで遠心し、0.22  $\mu$ mフィルターでろ過して滅菌し、そして使用するまで-70℃で貯蔵する。

好酸球生存およびパクリタキセルの効果—好酸球を末梢血から単離し、そして好酸球生存におけるNMおよびNP両方からのHECMの効果を以下の2つの異なる方法で決定する：時間経過および用量応答分析。時間経過実験において、約250,000/mlの濃度の好酸球を、50%HECMを有するまたは有さない(ネガティブコントロール)6ウェル組織培養物中でインキュベートし、そして生存指数を2、4、6および8日で評価する。他の実験は1～50%HECMで行う。HECM誘導好酸球生存にお

ける薬物(例えば、パクリタキセル)の効果が試験される実験において、0.1nM～10  $\mu$ Mの薬物(パクリタキセル)をHECMの添加の前の1時間にわたって37℃で好酸球とインキュベートする。各実験において、ネガティブコントロール(培地のみ)お

よびポジティブコントロール(HECM含有培地)ウェルを常に評価する。薬物がいかなる毒性効果を有するかを調査するために、薬物(種々の濃度)とインキュベートされた好酸球の生存度を、24時間にわたってRPMI10%のみで培養した好酸球と比較する。

B. サイトカイン遺伝子発現におけるパクリタキセルの効果および上皮細胞からの放出

鼻ポリープおよび正常鼻粘膜から得た上皮細胞をコンフルエンスまで培養し、パクリタキセル(または他の薬剤)を有するまたは有さずに生成したヒト上皮細胞条件培地および上清をELISAで測定する。サイトカイン遺伝子発現を、Mullolら、Clinical and Experimental Allergy 25:607-615、1995で記載されるように逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)で調査する。

結果は、パクリタキセルが好酸球生存を阻害する手段としてサイトカイン遺伝子発現を調節するかどうかを示す。1次細胞培養物を用いる主な欠点は、細胞がコンフルエントに達するまで10日かかることであり、局所環境および全身性効果から細胞機能を切り離し、これが第一に疾患を導く。しかし、これは構造細胞(例えば、上皮細胞)の機能および増殖を調節する成長因子を研究するために優れたインビトロ/エキスビボモデルであり、それにより粘膜炎症のいくつかの局面を明らかにする。

C. ヒト鼻ポリープからの化学的メディエータの免疫性放出

パクリタキセルおよび他の薬剤による媒介ーポリープを切除の時に得、Tyrode's緩衝液で5回洗浄し、そして鋭いハサミで断片化し、湿潤重量で約200mgの複製物にする。複製物を種々の濃度のパクリタキセルを含む3mlの緩衝液に37℃で懸濁し、0.2μg/mlの抗原Eで(5分後)チャレンジする。抗原とインキュベートした15分後、拡散気体を除去し、そして組織を新鮮な緩衝液で10分間ボイルし、

残留ヒスタミンを抽出する。放出されたヒスタミンおよびSRS-AをHPLCを用いてアッセイする。

実施例40

微小管機能を破壊する薬剤の血管周囲投与

再狭窄についての血管周囲処置としてのパクリタキセル-カンプトテシンを充填した外科用ペースト(PCL)および/またはEVAフィルムの効力を評価するために研究を行った。

#### A. 材料および方法

体重250～300gのWISTERラットをInnovar(0.33ml/kg)の筋肉内注射によって麻酔した。一旦鎮静されると、それらをハロタン麻酔下においた。全身麻酔を確立した後、頸部領域にわたって剃毛し、皮膚をクランプし、そしてベタジン(betadine)を塗布した。左頸動脈の上を垂直切開し、そして外部左頸動脈を露出させた。2つの結紮を外部左頸動脈のまわりに配置し、そして横断動脈切開を施した。次いで、番号2のFrench Fogartyバルーンカテーテルを頸動脈内に導入し、そして左総頸動脈内に通し、そしてバルーンを生理食塩水で膨らませた。内皮を、膨らませたバルーンを通して頸動脈を3度膨らませそしてしばませることにより剥皮した。次いで、カテーテルを除去し、そして結紮を左外部頸動脈上で結んだ。

ラットを、処置を受けない、ポリマーのみ(EVAフィルムまたはPCLペースト)、またはポリマーおよび20%パクリタキセルを受ける10のグループに無作為化した。ポリマー混合物(2.5mg)を頸動脈のまわりの周囲の様式で配置された。次いで創傷を閉じた。各グループから5匹のラットを14日で屠殺し、そして残りの5匹を28日で屠殺した。その間に、ラットを重量減少または全身系の疾患の他の徴候に関して観察した。14日または28日後、動物を麻酔し、そして左頸動脈を単離し、10%ホルムアルデヒド緩衝液で固定し、そして組織学的に検査した。

予備研究として、2匹のラットを10%カンプトテシンを充填したEVAフィルムで14日間処置し、この疾患モデルにおけるカンプトテシンの効力を評価した。

#### B. 結果

これらの研究からの結果によって、パクリタキセルを充填した(20%)ポリマーは再狭窄を完全に予防するが、コントロールの動物およびポリマーのみを受けた動物は、バルーン損傷後14日および28日で、28%と55%との間で管腔損傷が進行したことが明らかになった(図76Aおよび76B)。

パクリタキセルが血管壁に接触した場所で、初期過形成の絶対阻害があった。

しかし、血管壁に隣接する薬物を保持することができない場所でのパクリタキセルの不均一な効果によって証明されるように、効果は非常に局所的であった(図77Aおよび77B)。

予備データはカンプトテシンを充填したEVAフィルムが疾患の動物モデルでの再狭窄応答の予防において有効であることを示している。カンプトテシンは、試験された2匹の動物で初期過形成を完全に阻害した。

#### 実施例41

##### 外科的癒着の動物モデルにおけるパクリタキセルの効果

癒着形成を減少するためのパクリタキセルを充填したEVAフィルムの使用をウサギ子宮角モデルで検査する。

ニュージーランド雌性シロウサギを麻酔し、そして開腹を正中線切開によって行う。子宮角を露出し、そしてそれぞれ5 cm長の切片をメスを用いて剥離する。この剥離は漿膜を除去するのに十分であり、点状出血を生じる。ウサギを無作為にコントロールまたはパクリタキセル処置グループおよび2、4および8週間の術後評価期間に割り当てる。パクリタキセル処置グループにおいて、各ウサギ子宮角を剥離後にパクリタキセルを充填したEVAフィルムで完全に包む。筋腹膜(musculoperitoneal)層を縫合で閉じ、そして皮膚ステープルで皮膚層を閉じる。

動物を、術後2、4および8週間での癒着形成に関して評価する。動物を人道的に安楽死させ、そして検死を行う。子宮角を肉眼で、および標準的な顕微鏡技術を用いて組織学的に検査する。肉眼では、癒着は標準的な評価システムを用いて等級を付け、これは5 cmの子宮角が外傷を受けている事実に基づく；従って、癒着形成の程度を、癒着を含む領域の長さを測定することにより決定する。以下

の等級付けシステムを用いる：0＝癒着無し、1＝領域の25%で癒着、2＝領域の50%で癒着および3＝総癒着関与。癒着の重篤度を以下のように測定する：0＝分離に抵抗無し、0.5＝いくらか抵抗あり(中程度の力を要する)、および1＝鋭い解剖を要する。総等級は相加的であり、程度および重篤度の両方を表す0～4の癒着評価範囲を有する。

#### 実施例42

## 炎症性腸疾患(IBD)の処置におけるミセルパクリタキセル

炎症性腸疾患(IBD)、すなわちクローン病および潰瘍性大腸炎は、再発および緩解の期間によって特徴づけられる。IBDの最もよく利用されるモデルは、エタノールおよび生理食塩水の溶液中の2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNB)の結腸内注射によってラットに生じさせる(Morrisら、Gastroenterology、96:795-803、1989)。単回投与は、急性および数週間持続する慢性の炎症を惹起する。しかし、薬理学的に、ウサギ結腸はラットが似ているよりもヒト結腸に似ていることが示されている(Gastroenterology、99:13424-1332、1990)。

雌性ニュージーランド白ウサギを全ての実験で用いる。動物をペンタバルビトールを用いて静脈内注射(i.v.)で麻酔する。TNB(0.6ml; 生理食塩水中25%エタノールに40mg)の注入のために、乳児用摂食チューブを直腸に挿入し、その結果先端は肛門に対して20cm近位である。TNB投与の1週間後に、ウサギを3つの処置グループに無作為化する。この時に、動物は、無処置、ミセル単独(i.v.)またはミセルパクリタキセル(i.v.)のいずれかを受ける。これを全部で4回の処置の間、4日ごとに繰り返す。

研究の過程の間、ウサギを一般的な麻酔の状態の小児用気管支鏡を用いて内視鏡により週ごとに検査され、上記のように誘導される。損傷を以下のスケールに従って内視鏡操作者(知らされていない)によってスコアをつける: 0、異常無し; 1、炎症、しかし潰瘍形成無し; 2、1部位(<1cm)において炎症および潰瘍形成; 3、結腸の長さに沿って2つ以上の部位の炎症および潰瘍形成、または1つの主な部位の炎症および潰瘍形成(>1cm)。

最後の処置に次いで、ウサギをEuthanolを用いて24時間、ならびに1、2、4および6週間で屠殺する。全体の結腸を単離し、切除しそして抗腸管膜の境界にそって切開し、生理食塩水で洗浄し、そして抗生物質を含むHank's平衡化塩溶液中に配置される。結腸を立体顕微鏡で検査し、そして内視鏡と同じ判断基準に従ってスコアを付ける。また、結腸標本を、明らかに炎症性および潰瘍形成領域から、ならびに肛門から上向きに結腸への全体の長さにわたる正常結腸からの両方で部検において選択される。組織を10%ホルムアルデヒド中で固定し、そしてパ

ラフィン中に埋め込むように加工し；5 (m) セクションを切断し、そしてヘモトキシリン(hemotoxylin)およびエオシンで染色する。スライドをIBD組織病理学の存在または非存在に関して検査する。

最初の実験は、TNBの結腸内注射によってウサギに大腸炎を誘導した後、経口パクリタキセルの使用のために改変され得る。動物を、無処置、ビヒクル単独または経口処方されたパクリタキセルを受ける3つのグループに無作為化される。

#### 実施例43

##### 全身性紅斑性狼瘡の動物モデルにおけるパクリタキセルの効果

全身性紅斑性狼瘡におけるパクリタキセルの効力は、雌性NZB/NZW<sub>F1</sub> マウス(B/W)をミセルパクリタキセルで処置することにより決定される。このマウスの系統はヒトSLEに類似の疾患を進行する。1月齢において、これらのマウスは、正常マウスに比べて自発的に免疫グロブリンを分泌する上昇したレベルの脾臓B細胞を有する。高レベルの抗ssDNA抗体は、2月齢で生じる。5月齢で、免疫グロブリンは、糸球体の毛細血管壁に沿って蓄積する。重篤な糸球体腎炎は進行し、そして9月齢までにB/Wマウスの50%が死亡する。

##### A. 材料および方法

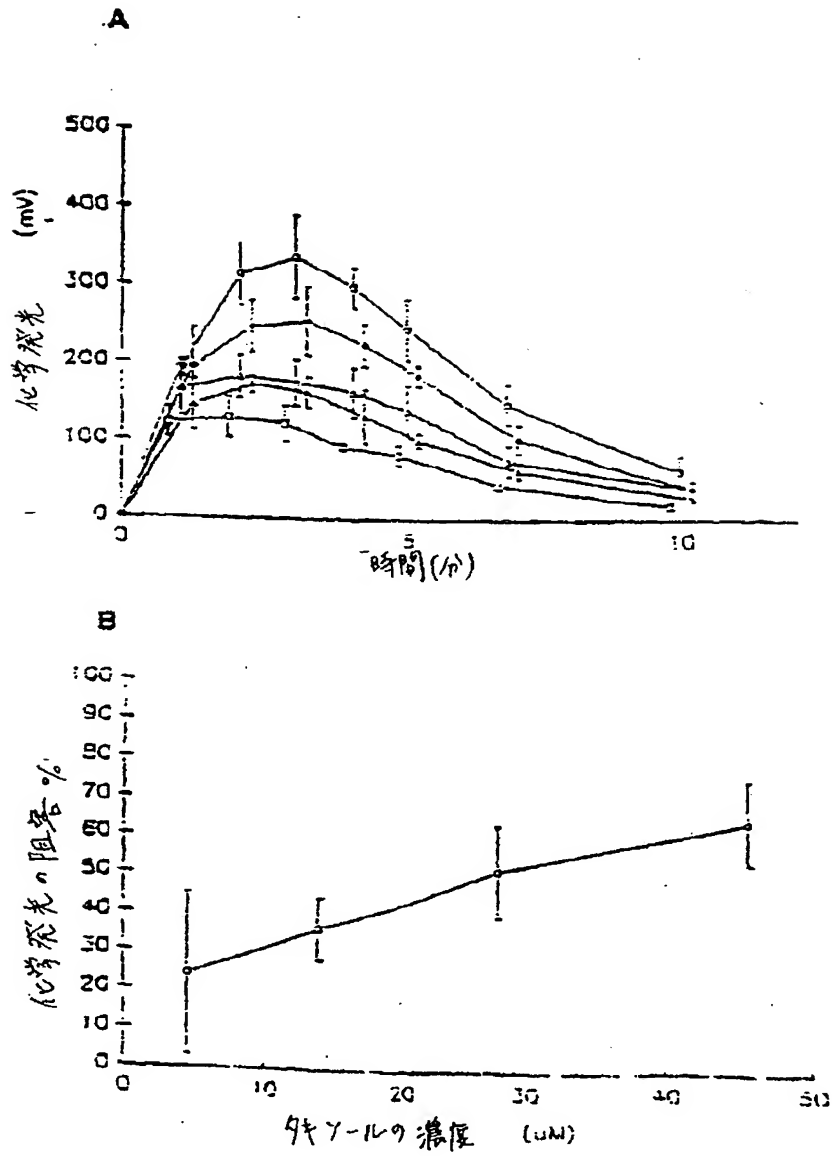
雌性B/Wマウスを、The Jackson Laboratory(Bar Harbor、ME、USA)から購入する。5月齢雌性B/Wマウスを、処置およびコントロールグループに無作為に割り当てる。処置グループは、低容量継続ミセルパクリタキセル(2.0mg/kg；1週間当たり3回、合計10回の注射)または高用量「パルス」ミセルパクリタキセル(20mg/kg；4回、1週間に1度)のいずれかを受ける。コントロールグループはコントロールミセルを受ける。

所定の時間間隔で、類似の年齢のパクリタキセル処置されたB/Wマウスおよび未処置のコントロールB/Wマウスを屠殺し、これらの脾臓を無菌的に除去し、そして単一細胞懸濁液をリンパ球を数えるために調製する。脾臓リンパ球亜集団を同定するために、蛍光分析を行う。自発的に免疫グロブリンまたは抗ssDNA抗体(IgG、IgM、総免疫グロブリン)を分泌する脾臓B細胞数(細胞/百万)を、ELISAを用いて決定する。

上記より、本発明の特定の実施態様は例示のために本明細書中で記載されたが、種々の改変が、本発明の精神および範囲を逸脱することなくなされ得ることが理解される。従って、本発明は、添付の請求の範囲による以外は制限さない。

【図1】

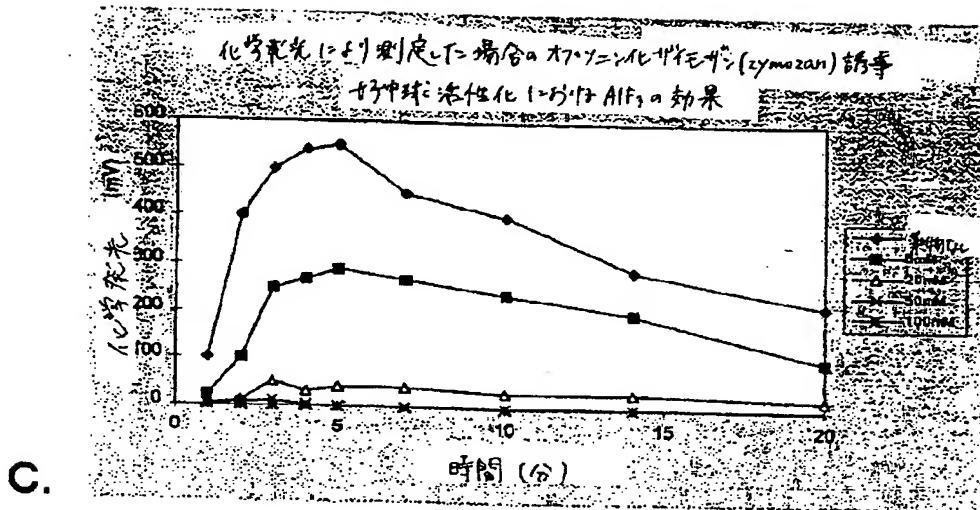
FIGURE 1A-1B



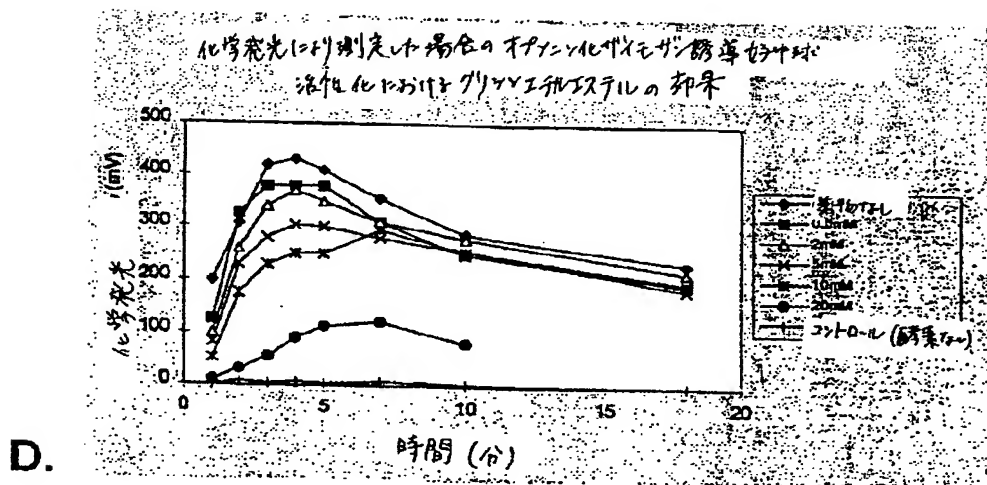


【図1】

FIGURE 1



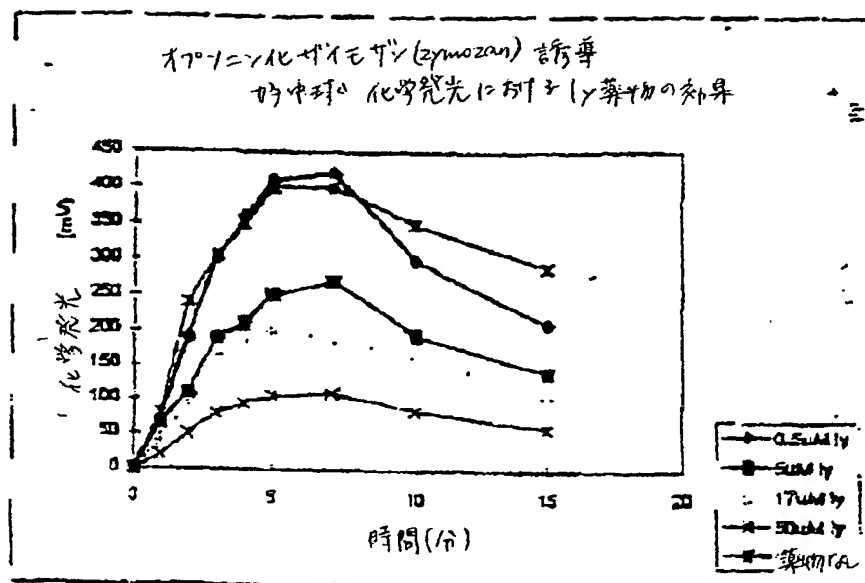
C.



D.

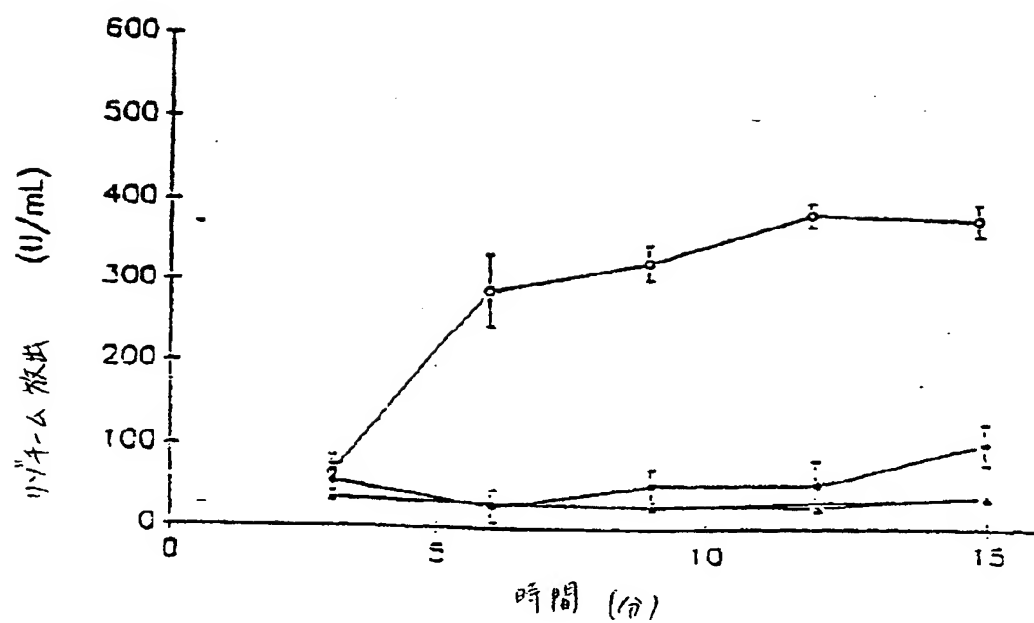
【図1】

FIGURE 1E



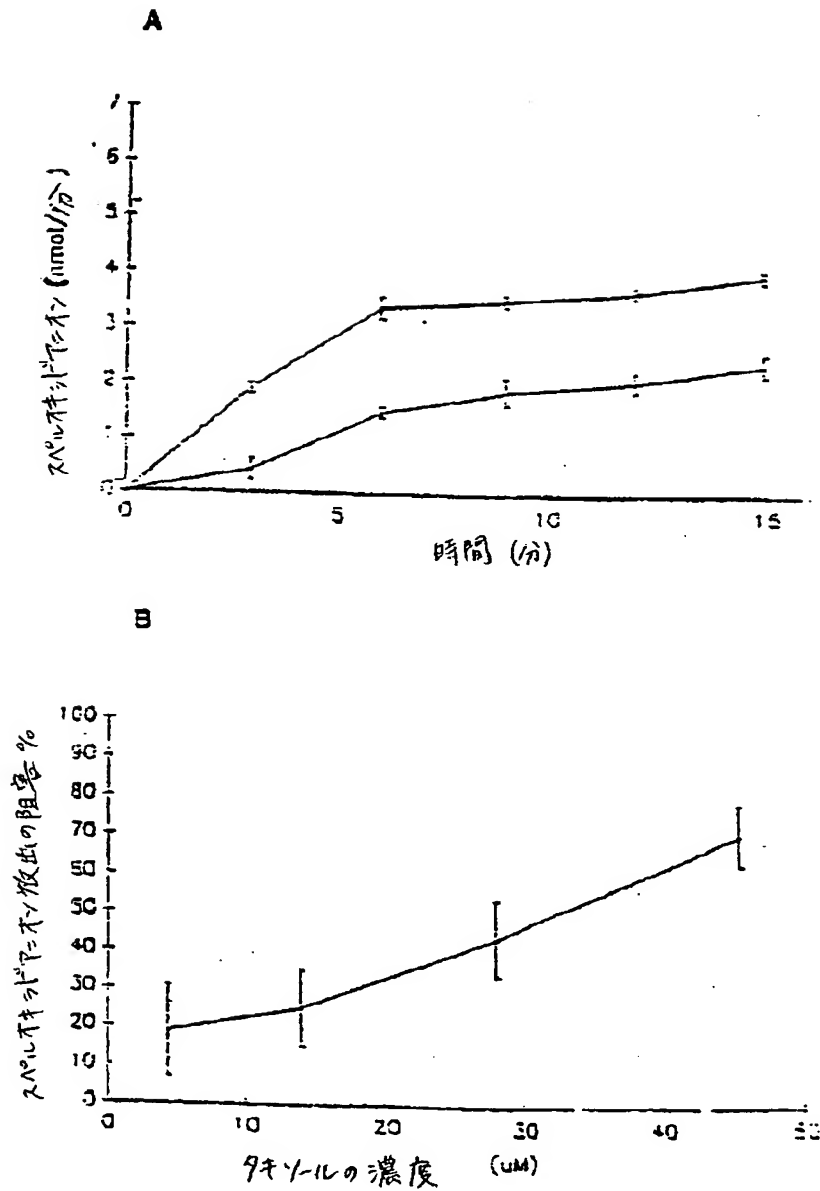
【図2】

FIGURE 2



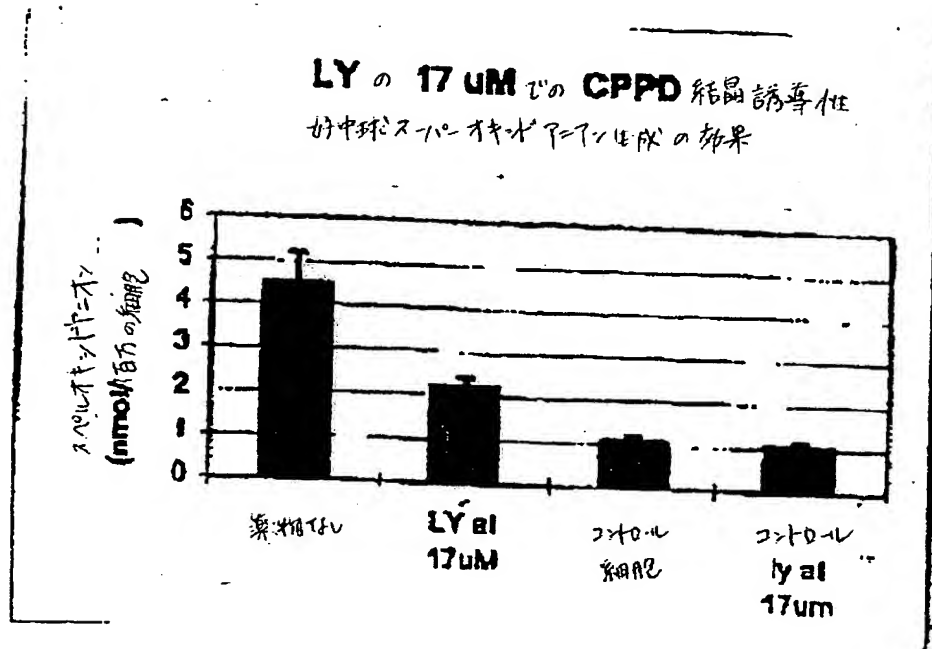
【図3】

FIGURE 3A-3B



【図3】

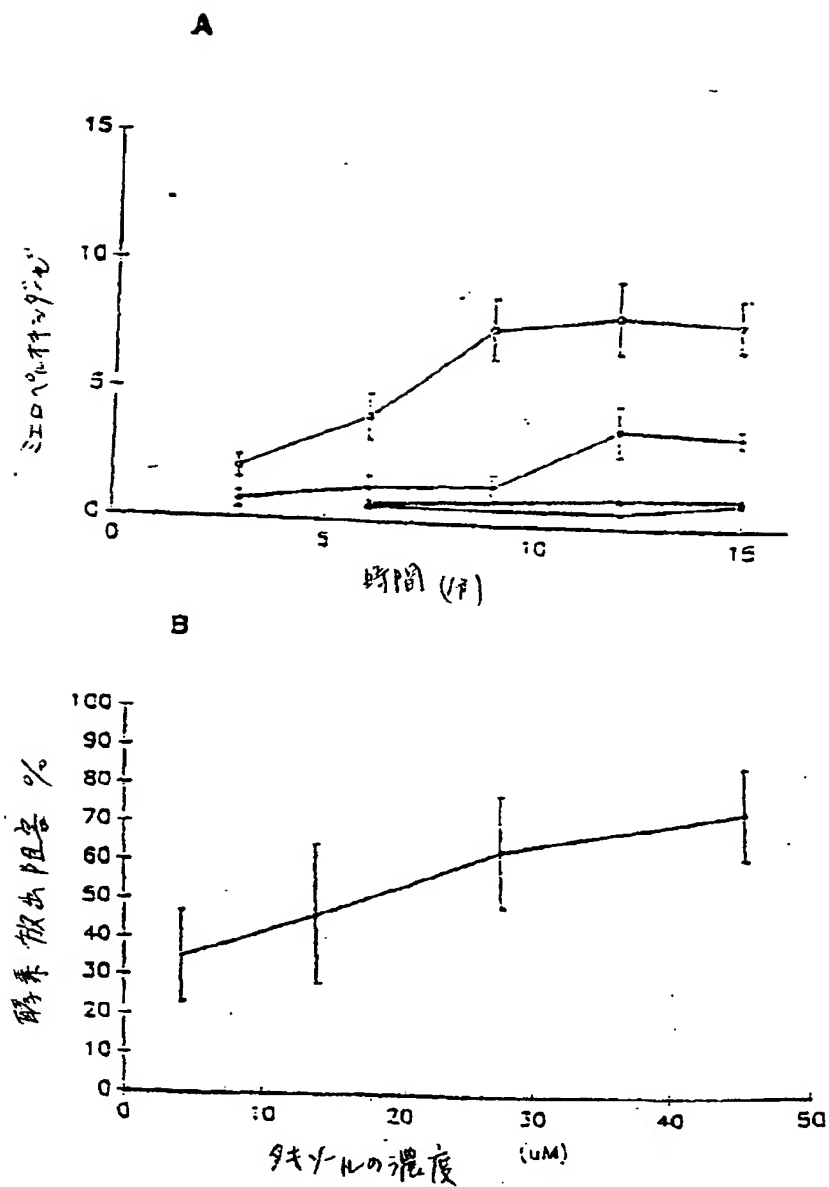
FIGURE 3C





【図5】

FIGURE 5A-5B



【図5】

FIGURE 5C

CPPD結晶誘導分解における17 $\mu$ MのLY  
の効果 (リジン放出)

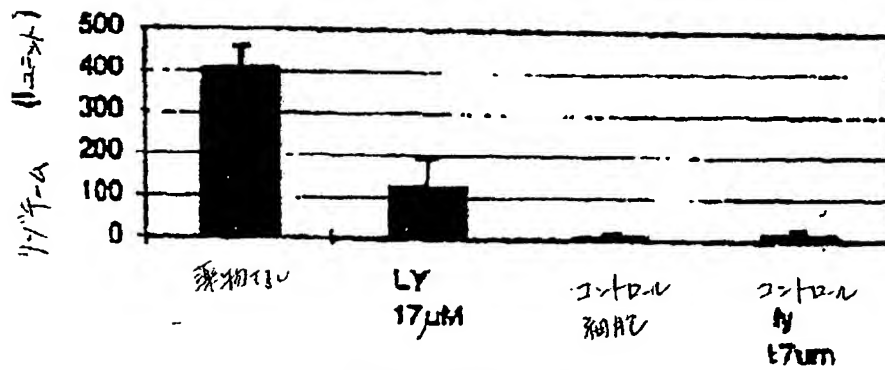
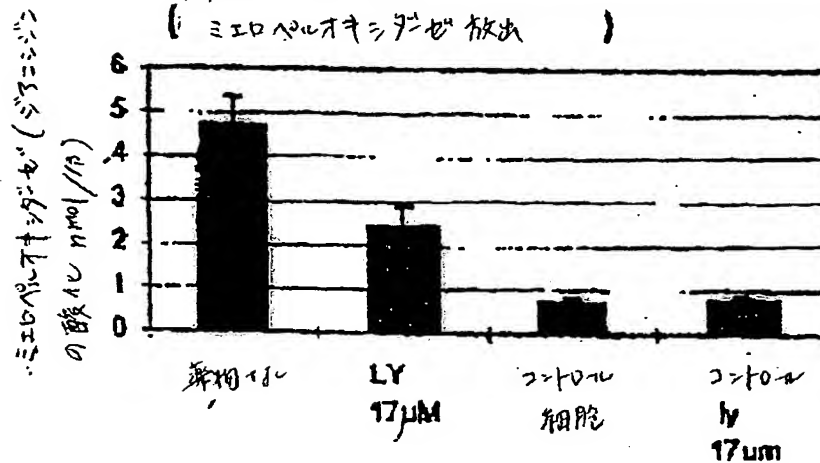


FIGURE 5D

CPPD結晶誘導好中球分解における  
17 $\mu$ MのLYの効果  
(ミエロペルオキシダーゼ放出)

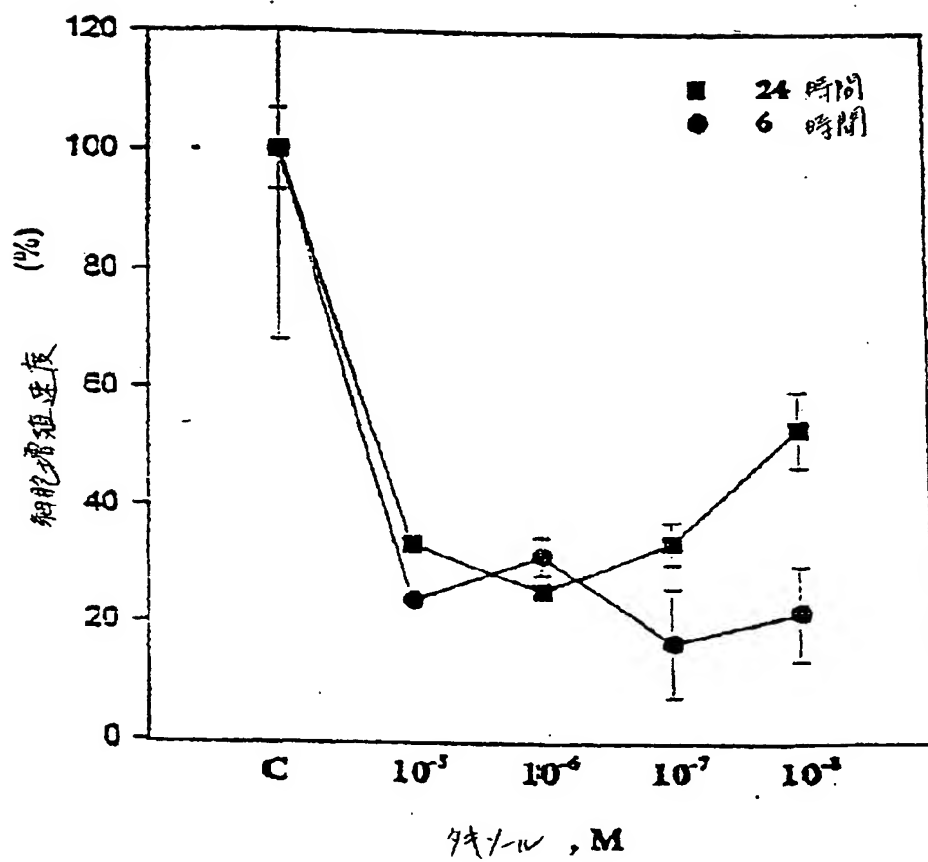




【図6】

FIGURE 6

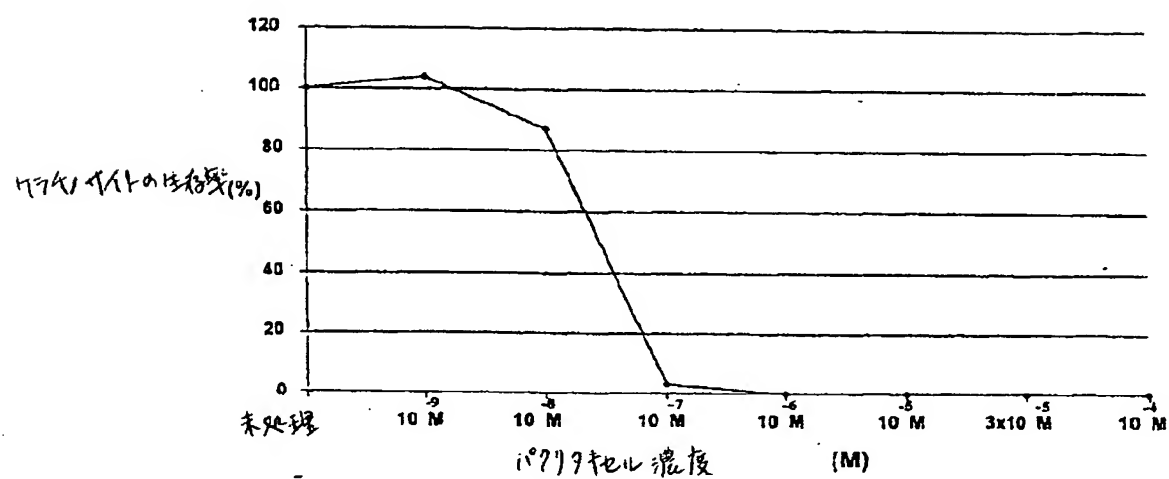
星状細胞の増殖アッセイ



【図7】

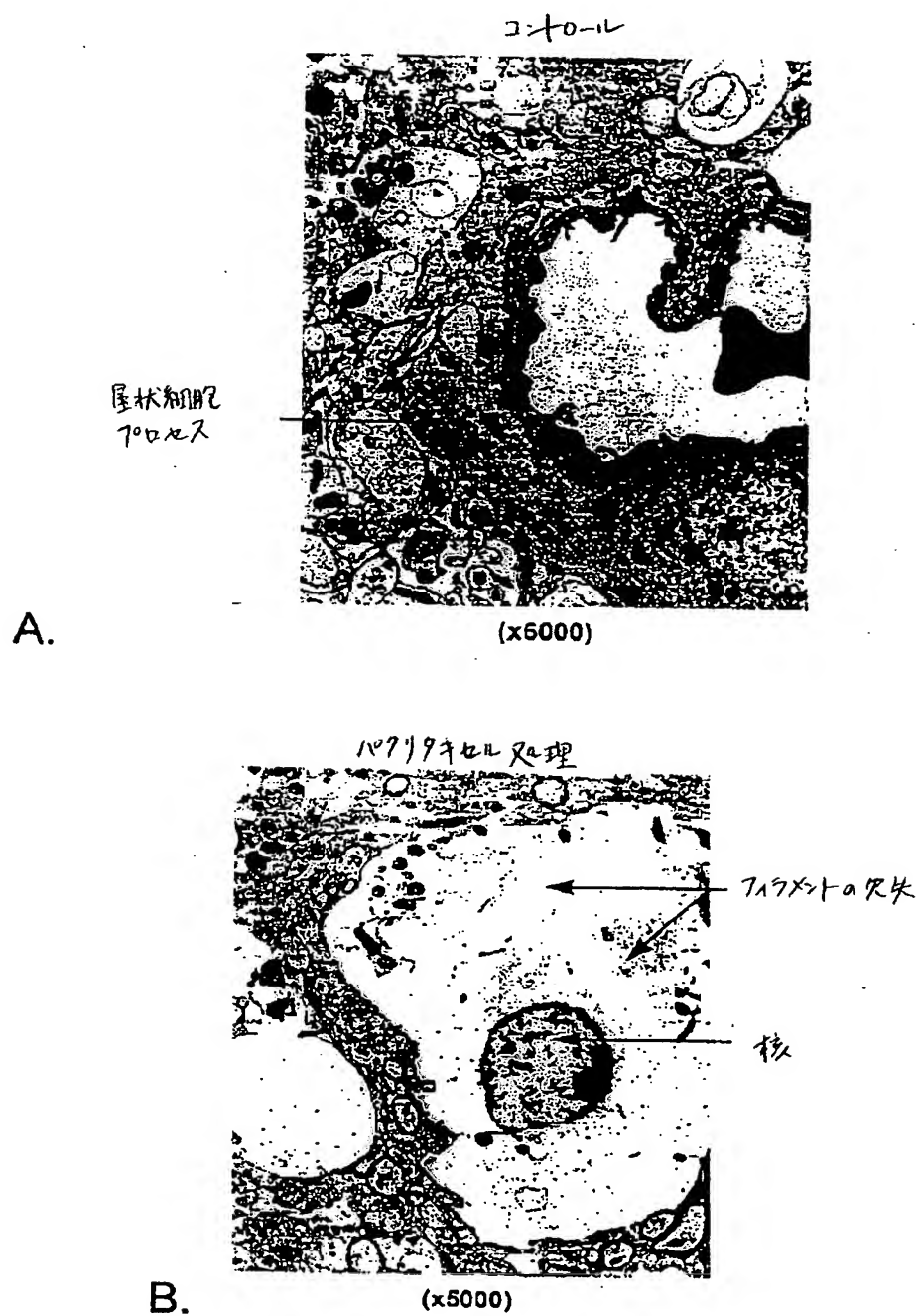
## FIGURE 7

H7A1サイトにおけるパブリックセルの効果 (インビトロ)



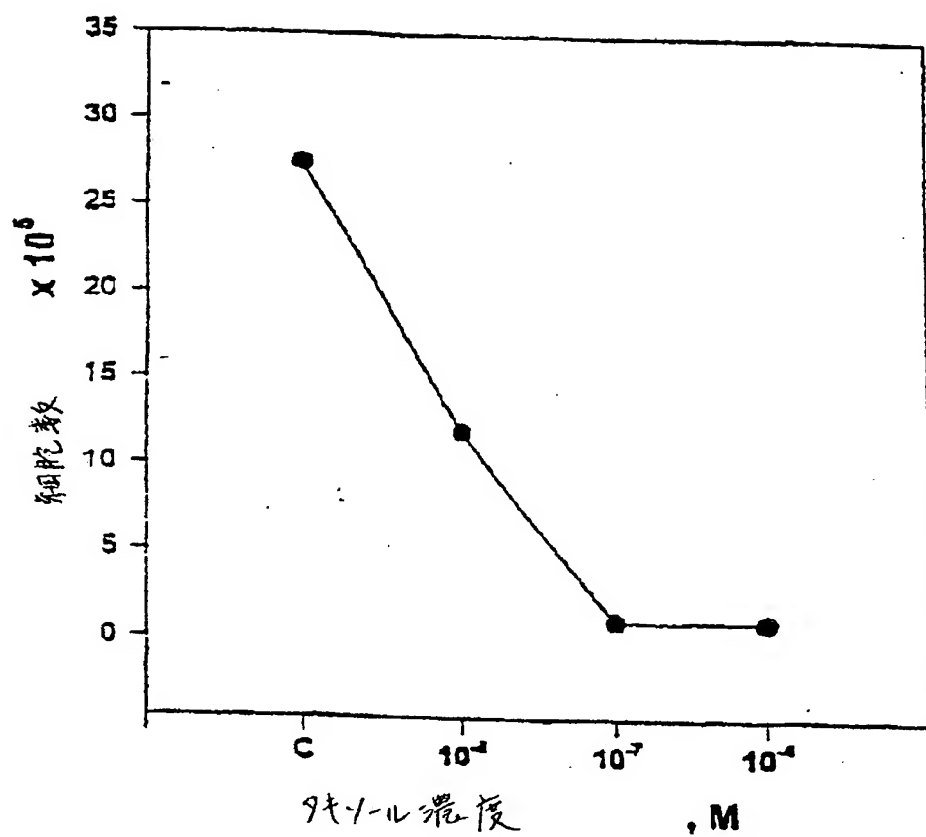
【図8】

FIGURE 8



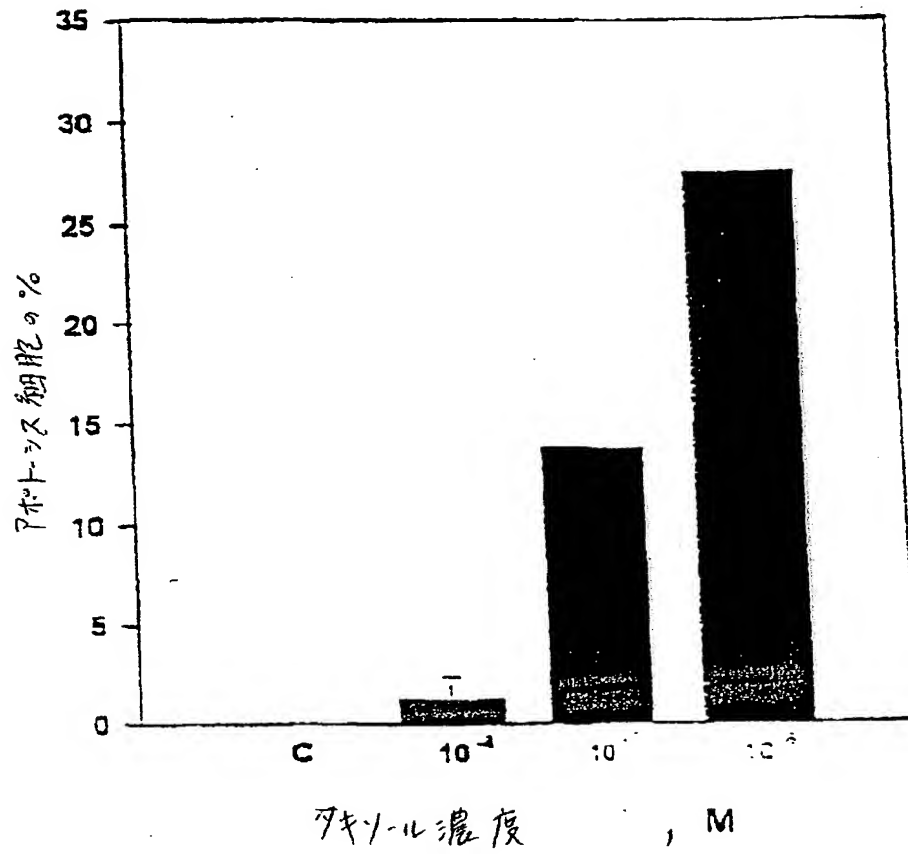
【図9】

FIGURE 9



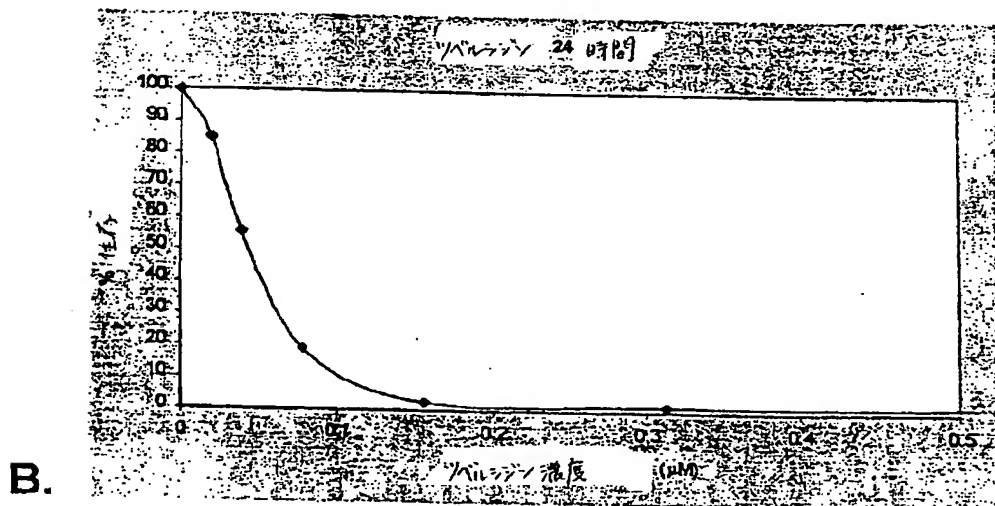
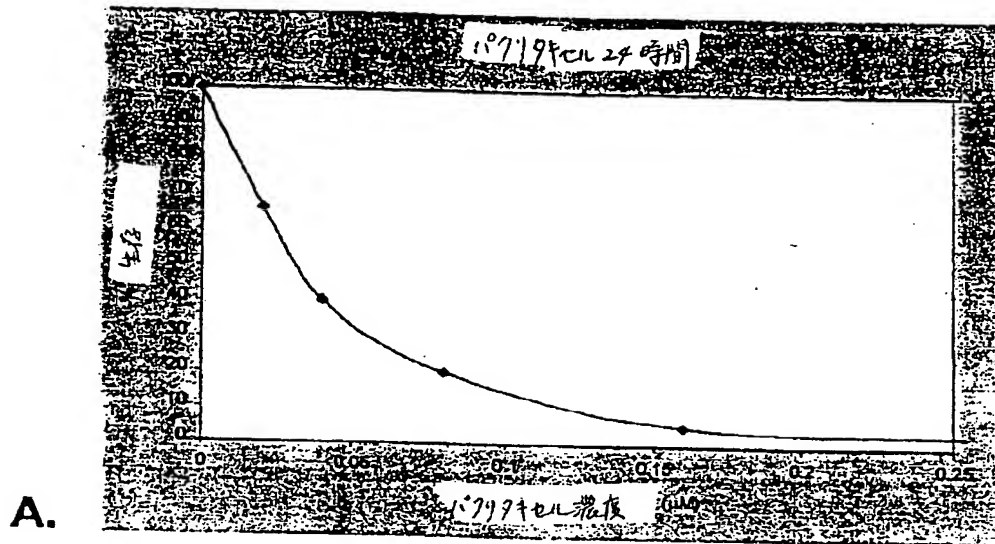
【図10】

FIGURE 10



【図11】

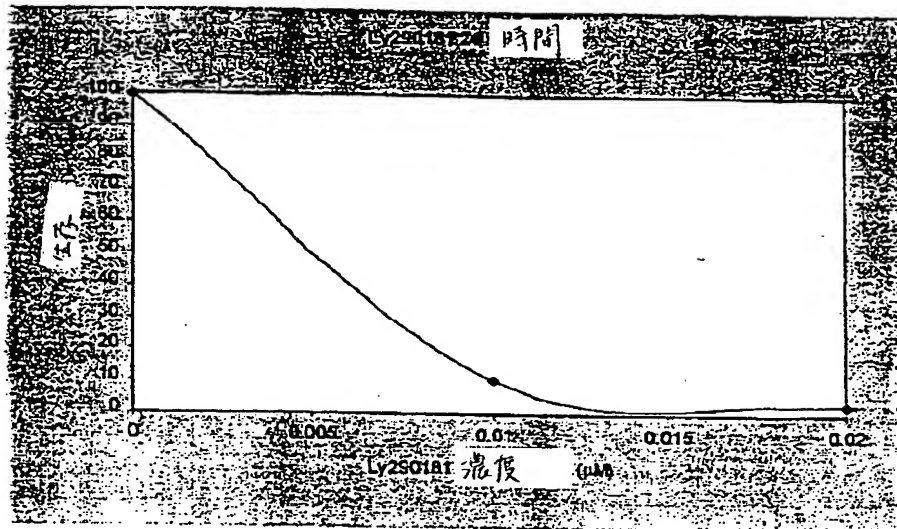
FIGURE 11



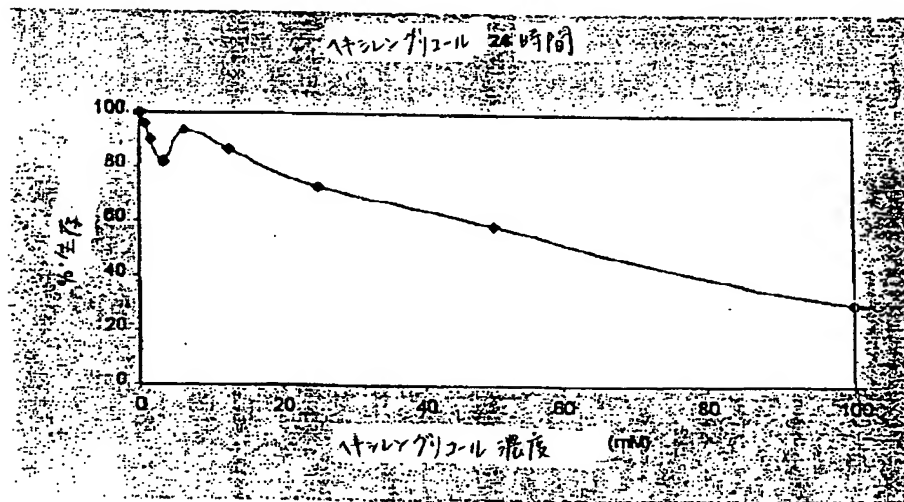
【図11】

FIGURE 11

C.

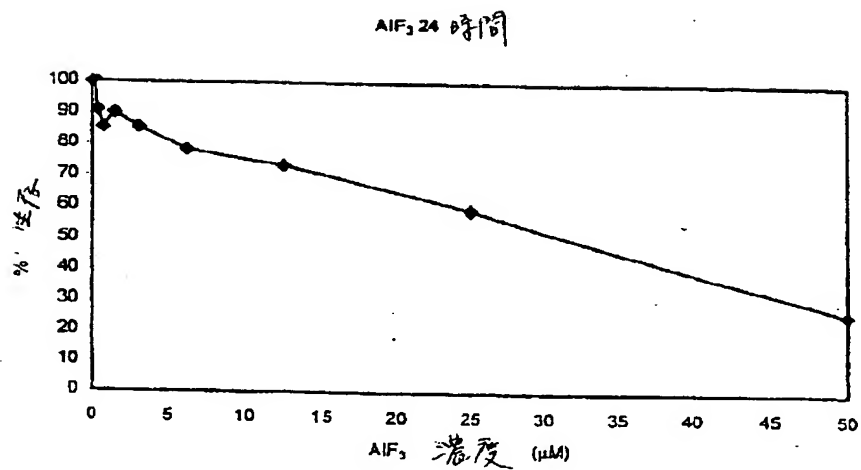


D.

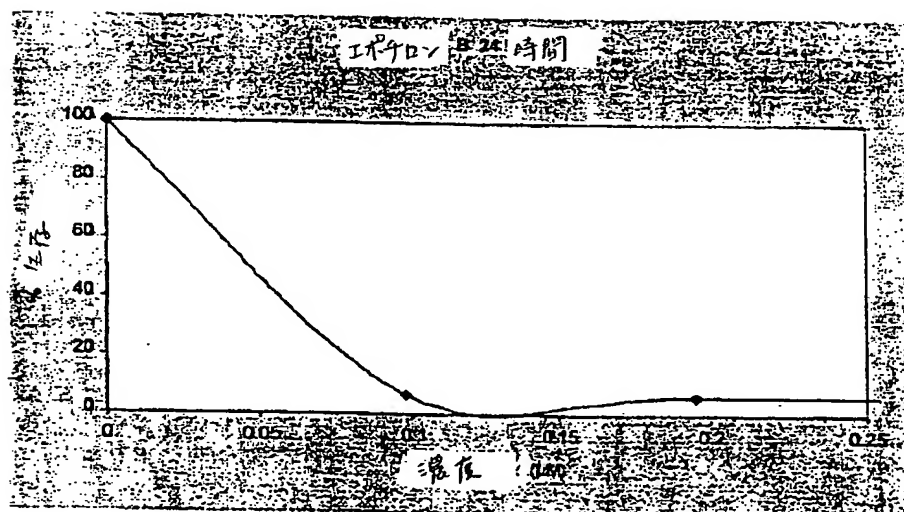


【図11】

FIGURE 11



E.

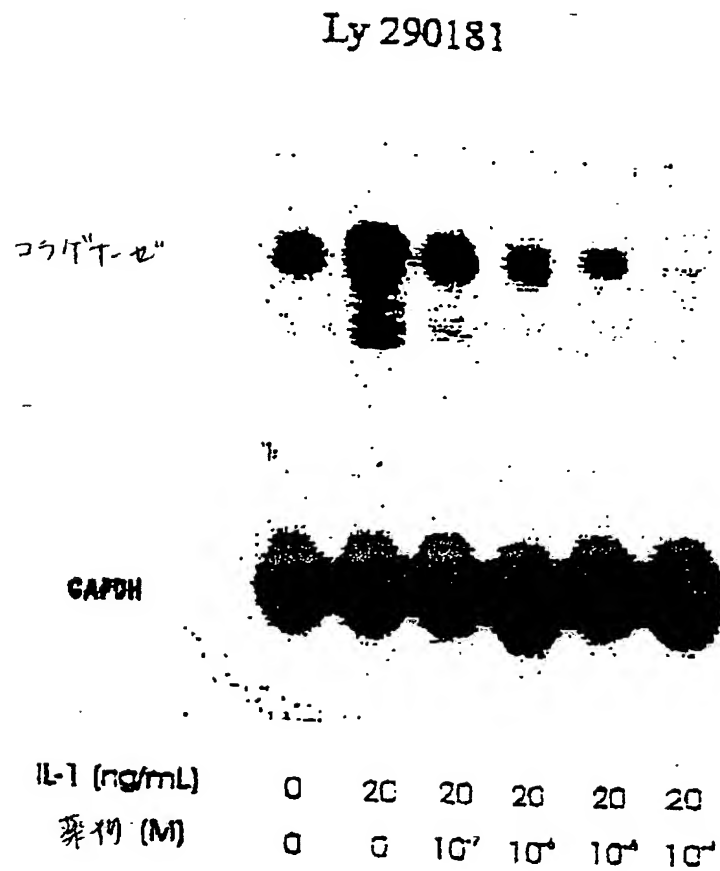


F.



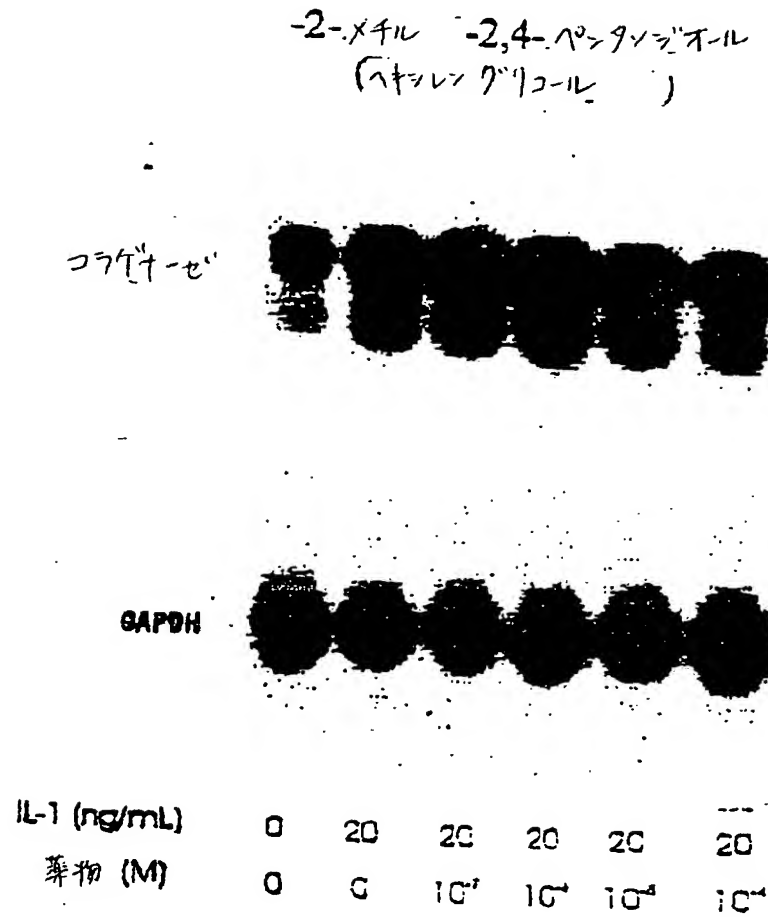
【図12】

FIGURE 12A



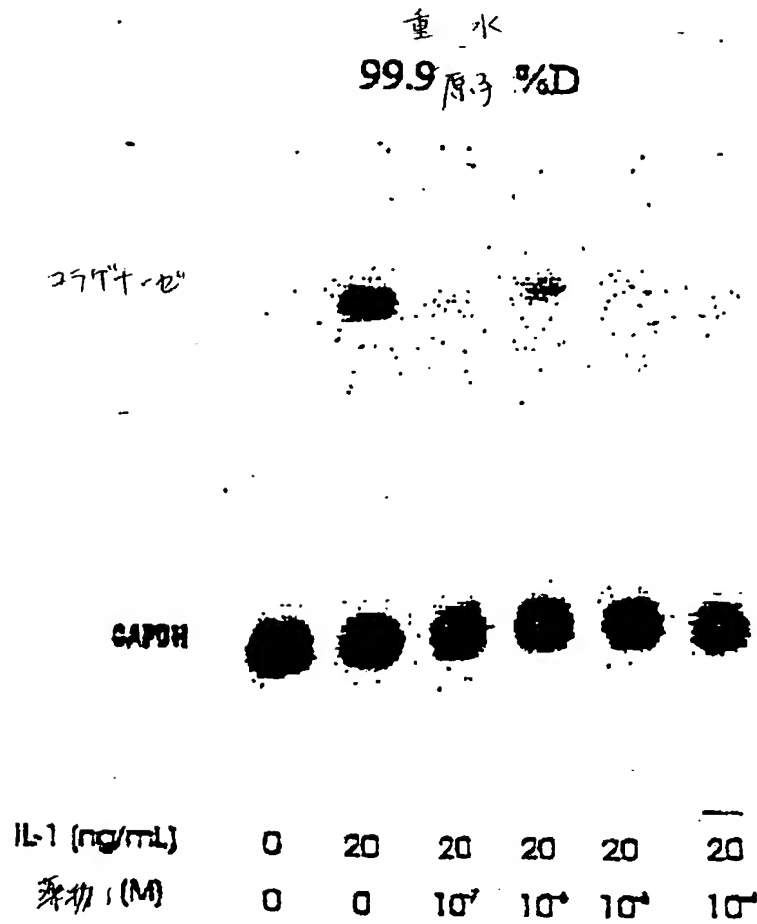
【図12】

FIGURE 12B



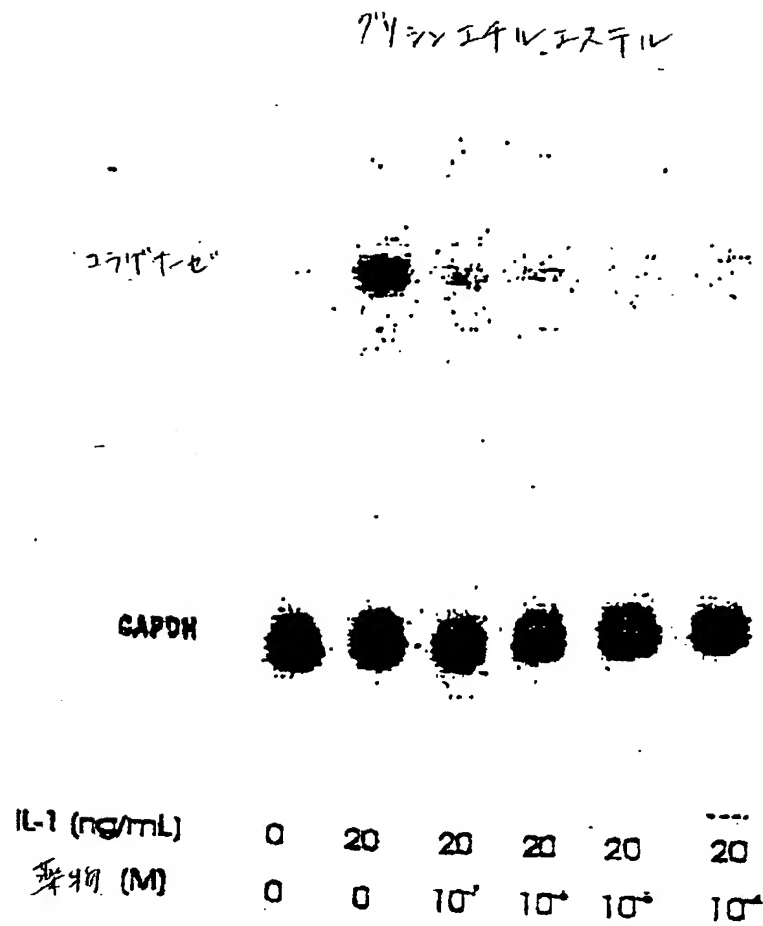
【図12】

FIGURE 12C



【図12】

FIGURE 12D



【図12】

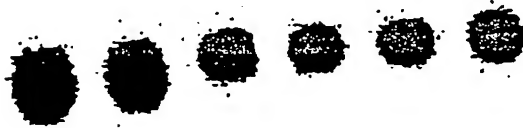
FIGURE 12E

エチレンジアミンベース  
(スチレンイミダズレンスチレン)

コラゲナーゼ



GAPDH



IL-1 (ng/mL)

C

20

20

20

20

20

薬物 (M)

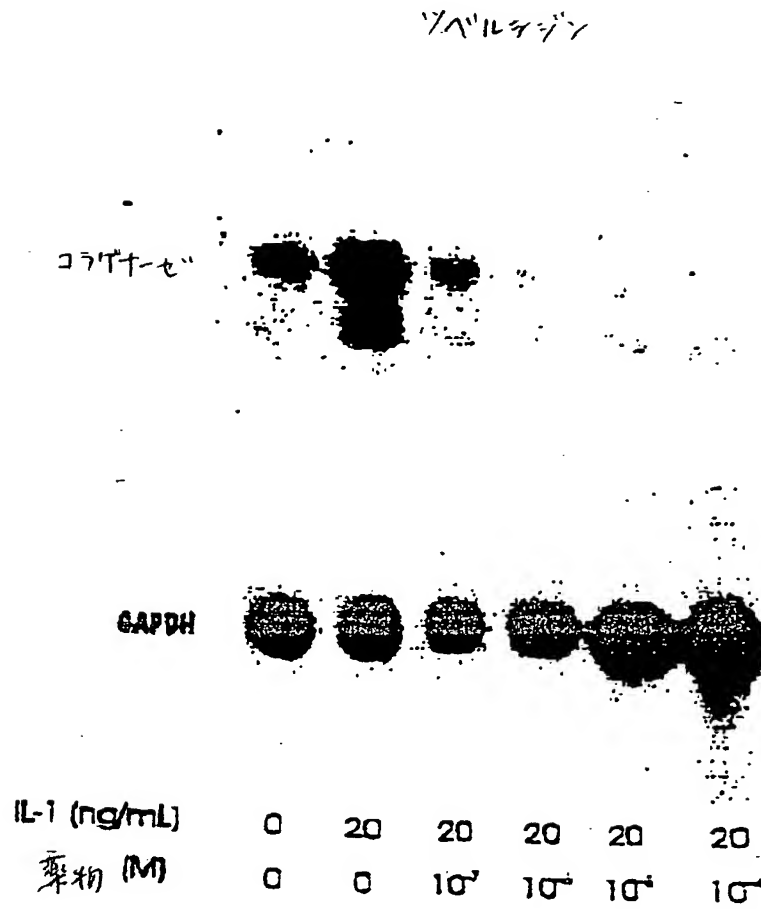
C

C

 $10^{-4}$  $10^{-4}$  $10^{-4}$  $10^{-4}$

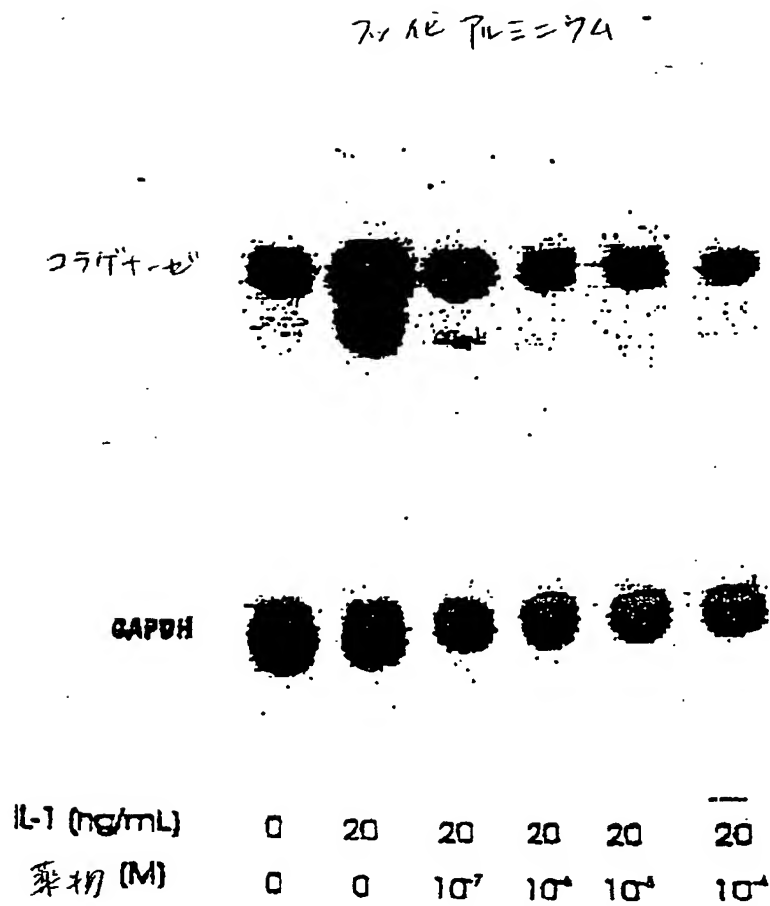
【図12】

FIGURE 12F



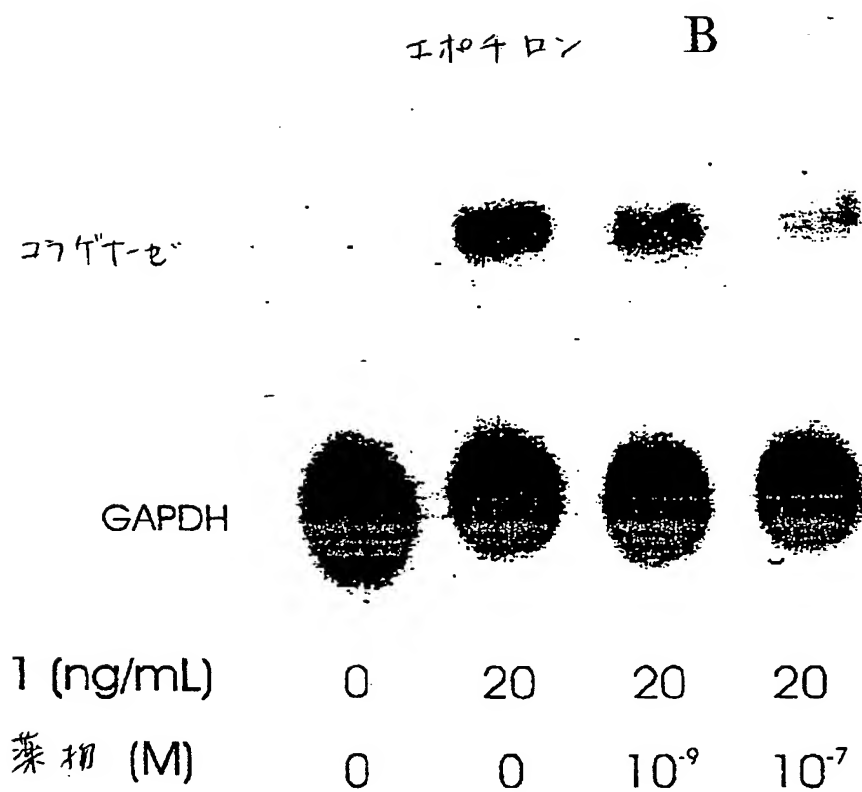
【図12】

FIGURE 12G



【図12】

FIGURE 12H





【図13】

FIGURE 13A

Ly 290181

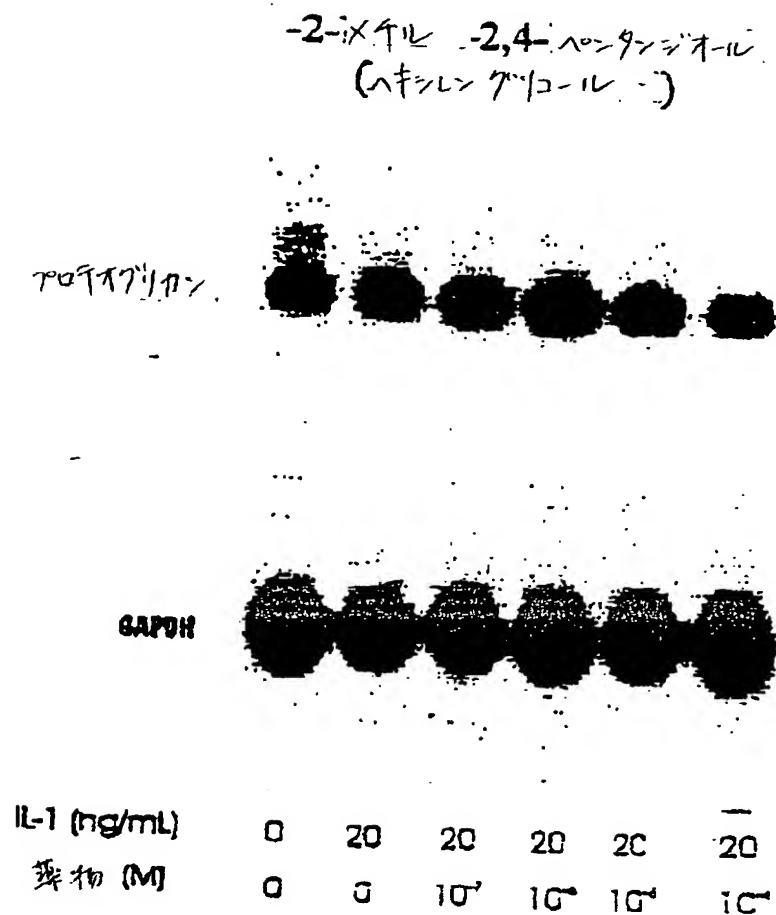
アロテオグリン

CAPON

IL-1 (ng/mL)	0	20	20	20	20	20
薬物 (M)	0	0	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$

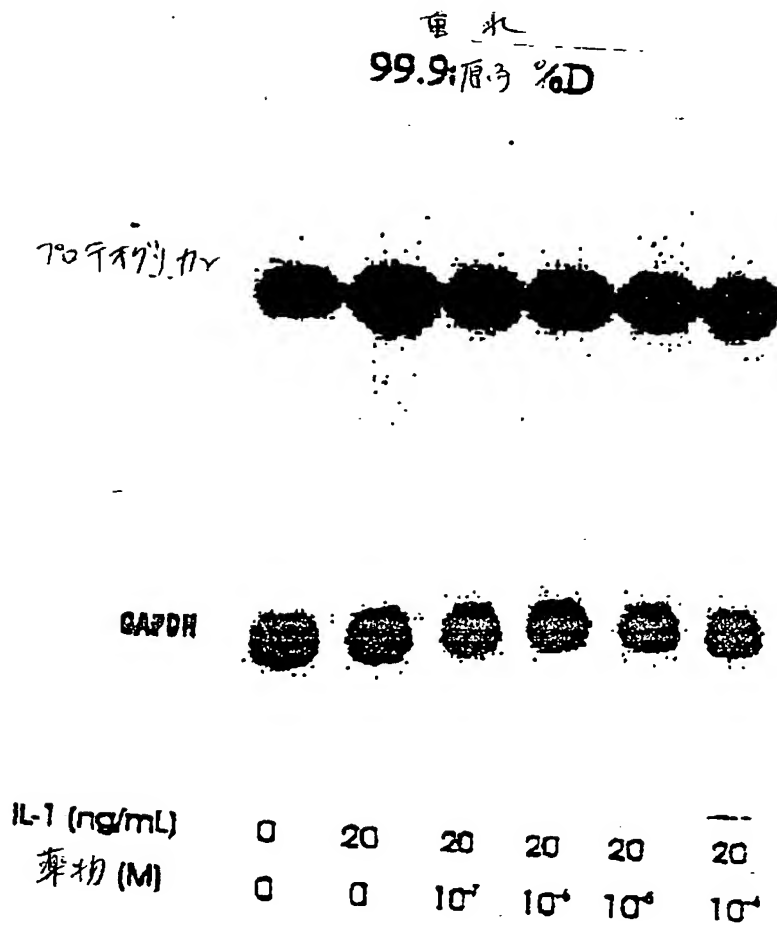
【図13】

FIGURE 13B

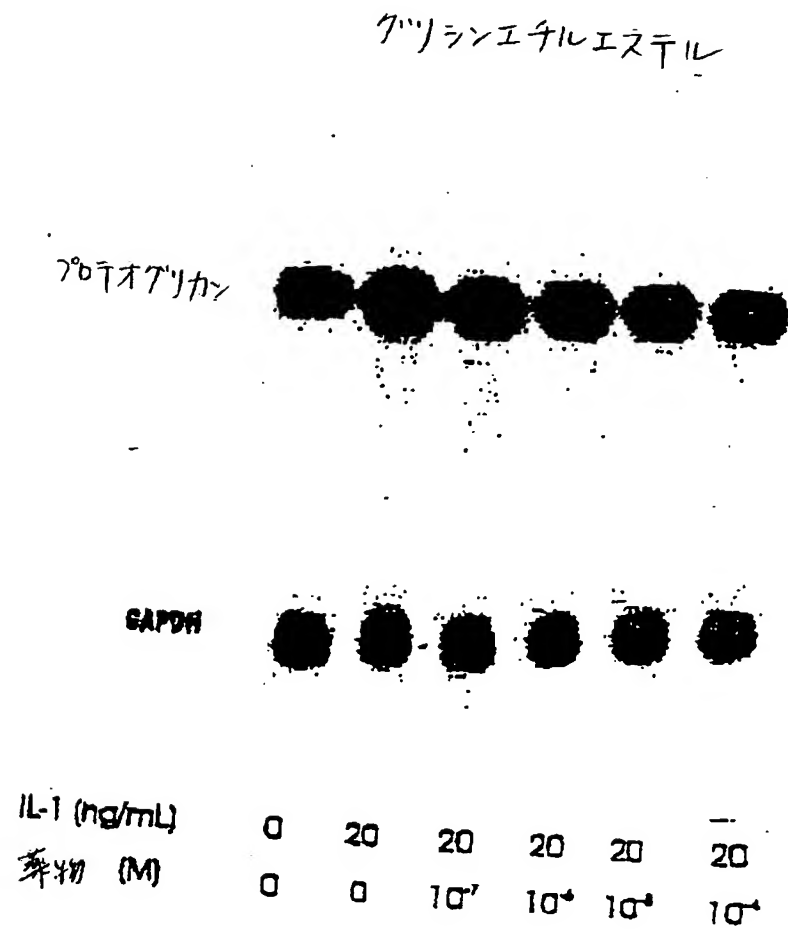


【図13】

FIGURE 13C

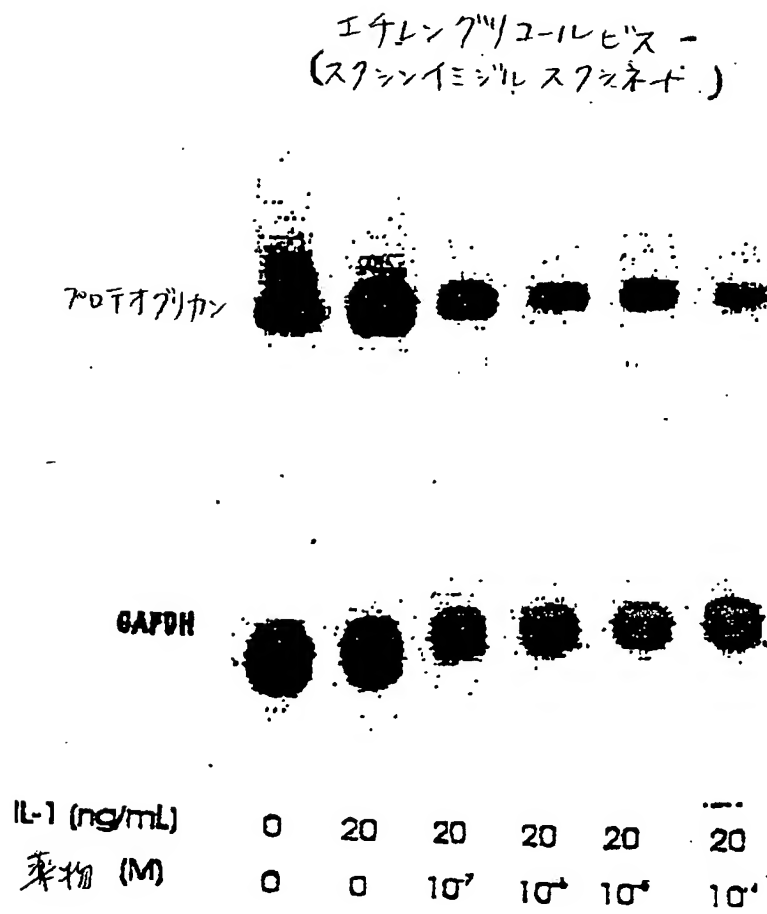


**FIGURE 13D**



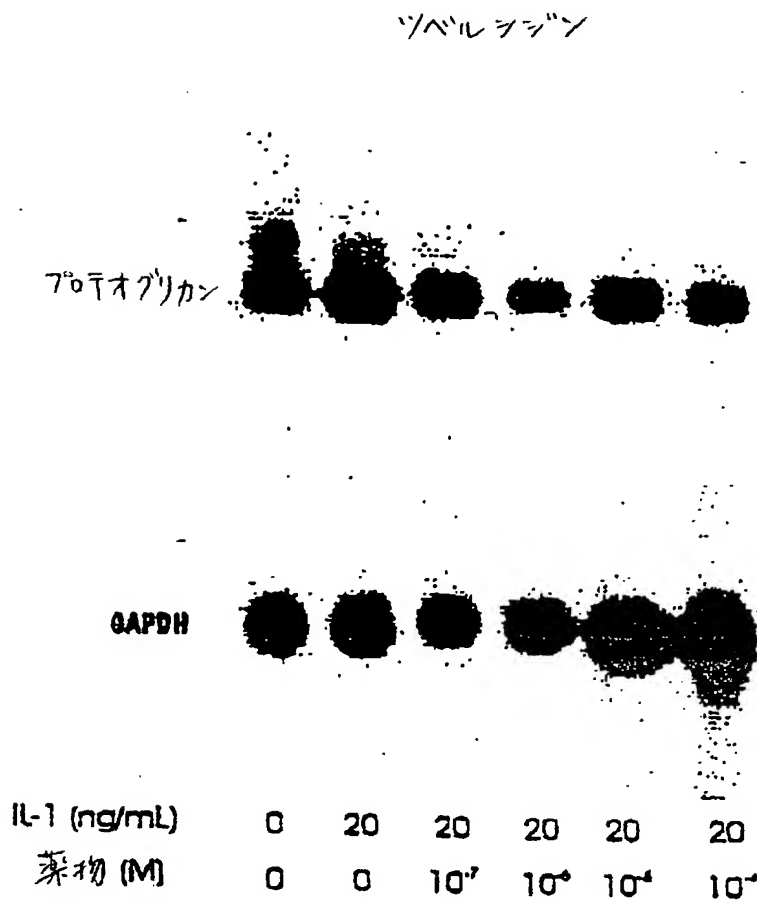
【図13】

FIGURE 13E



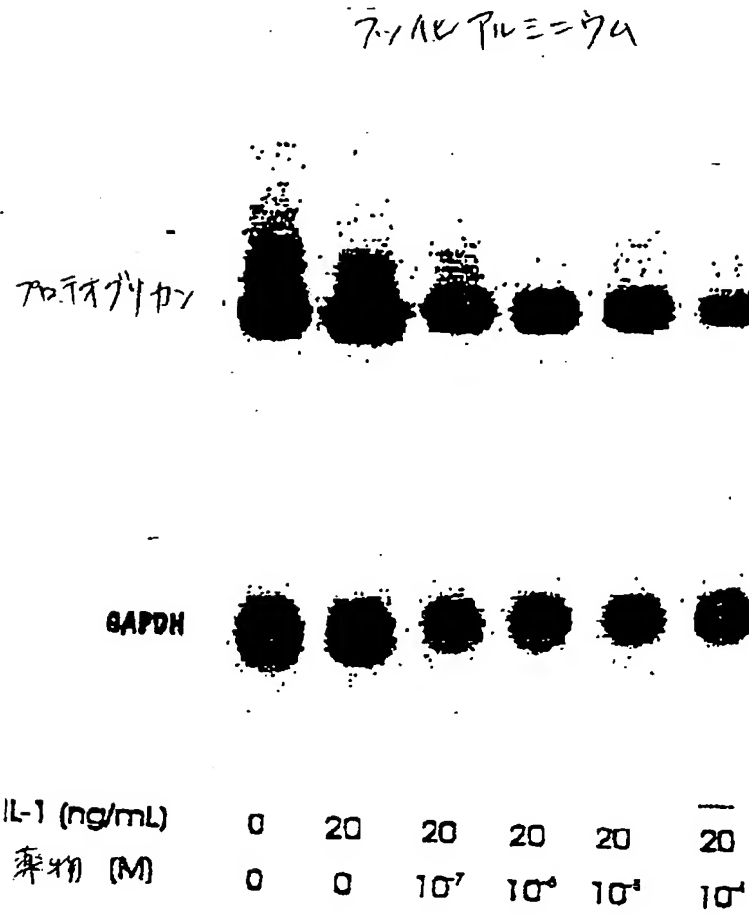
【図13】

FIGURE 13F



【図13】

FIGURE 13G



【図14】

FIGURE 14A



FIGURE 14B





【図14】

FIGURE 14C

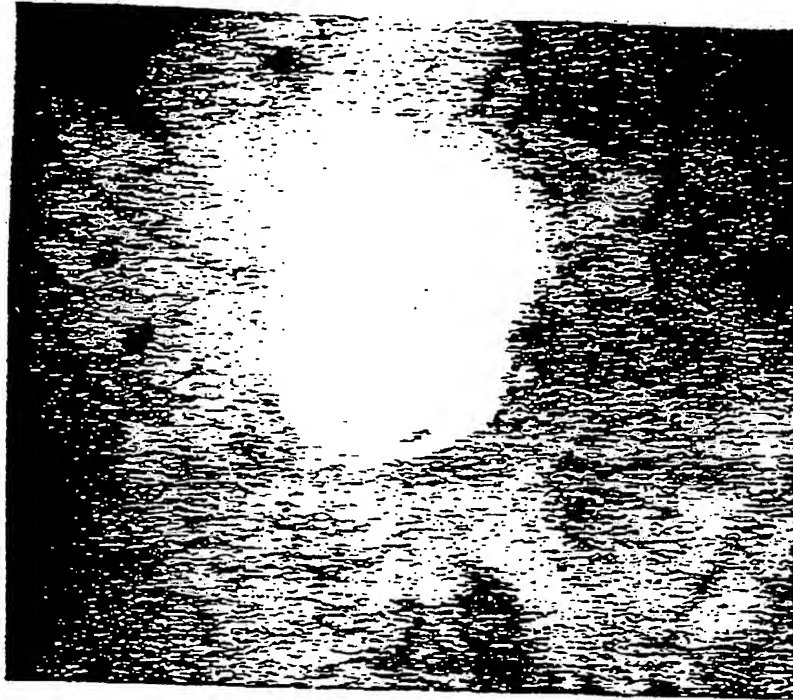
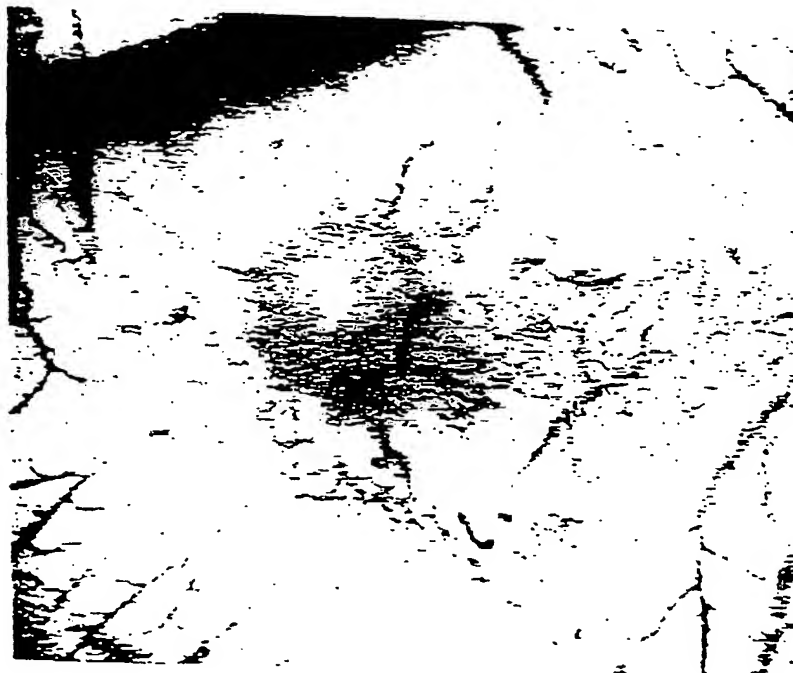
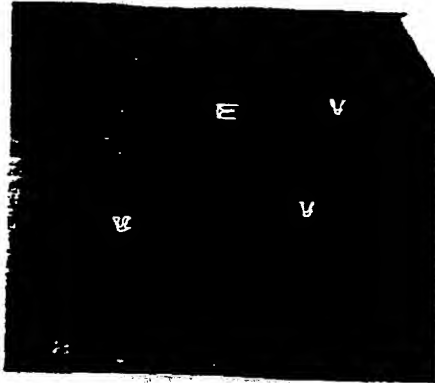


FIGURE 14D

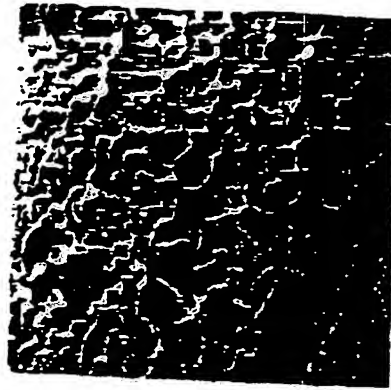


【図15】

FIGURE 15A-15E



A



C



E



d

D



B



【図16】

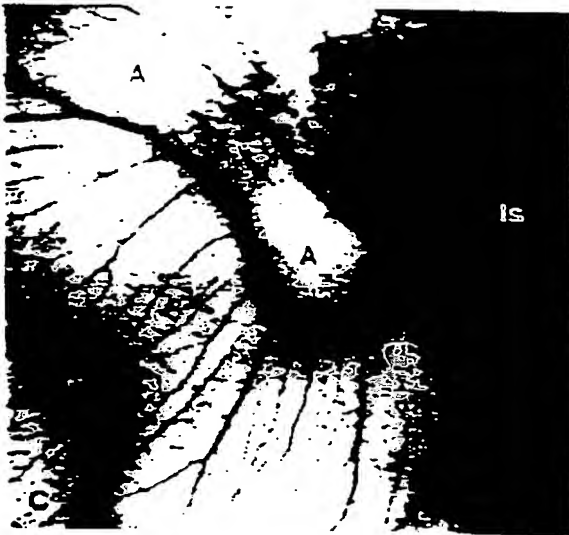
FIGURE 16A-16D



A



B



C



D

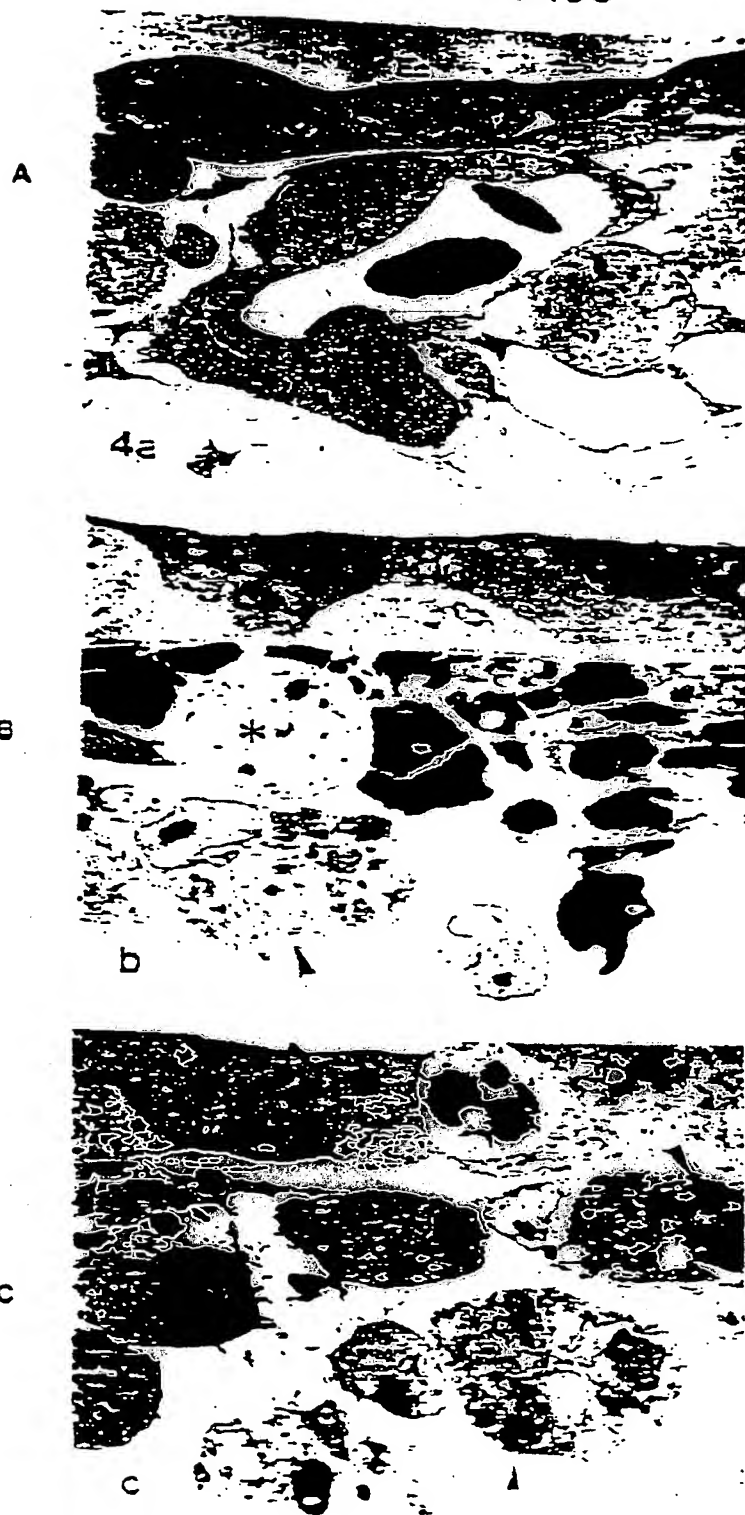
【图17】

FIGURE 17A-17C



【図18】

FIGURE 18A-18C



MMPの転写調節

【図19】

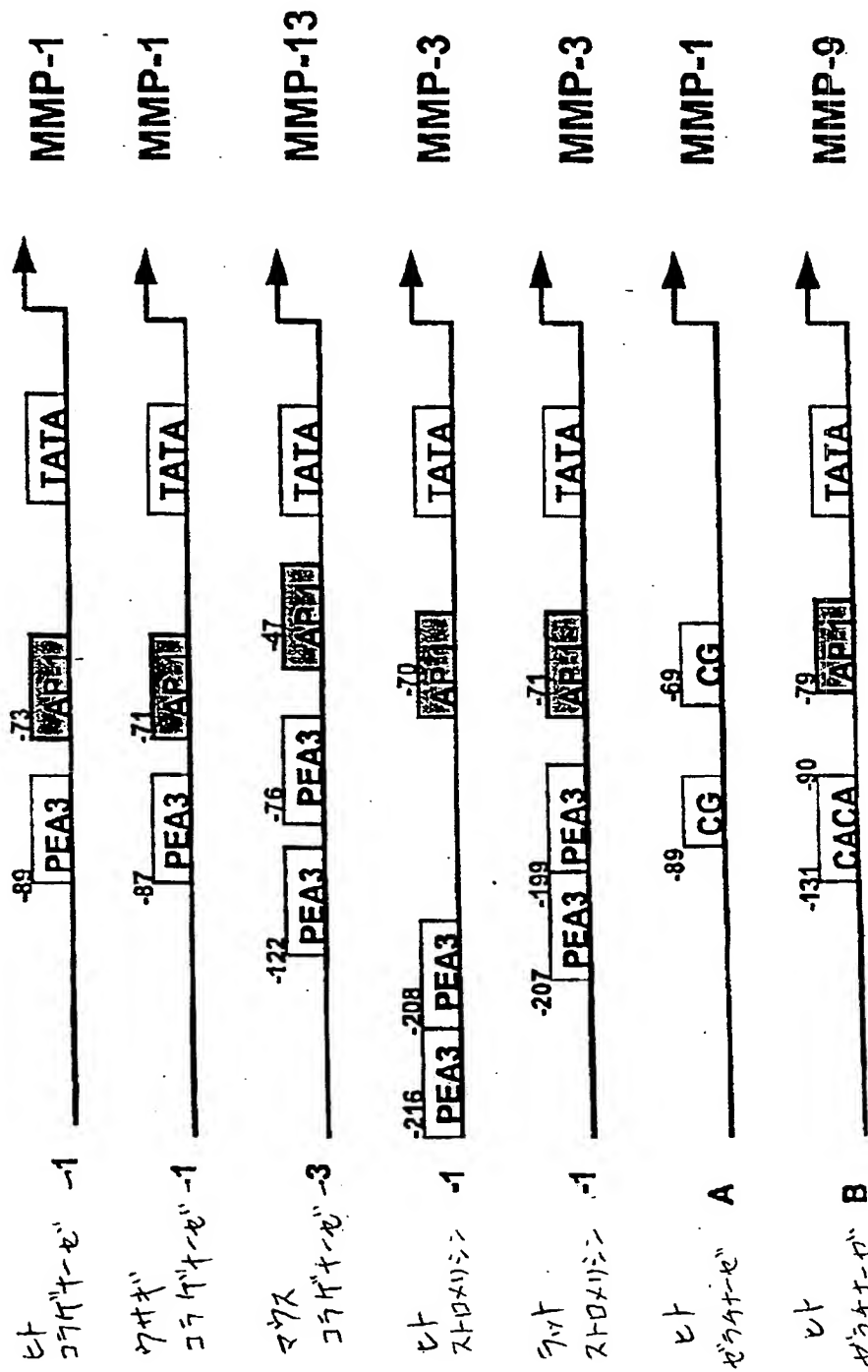


FIGURE 19A

【図19】

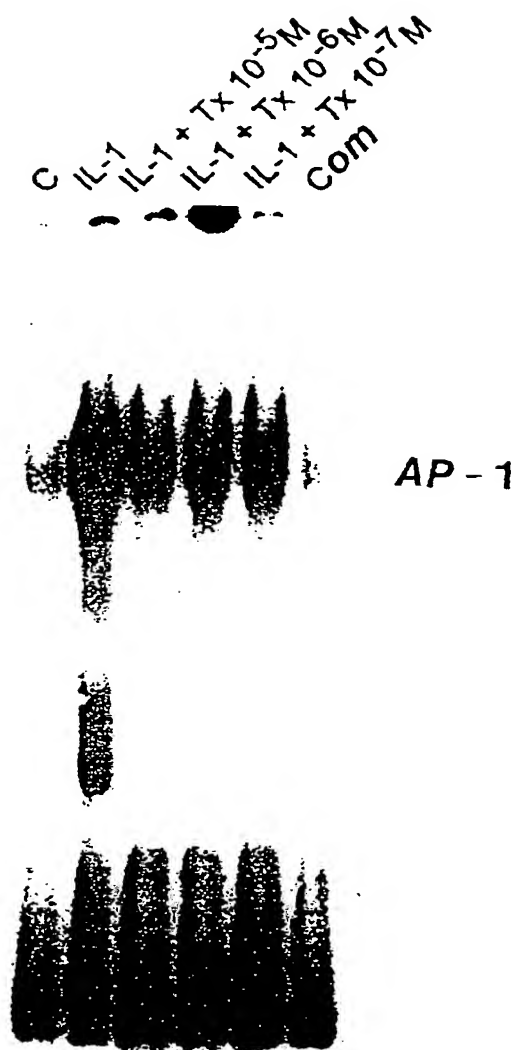


FIGURE 19B

【図19】

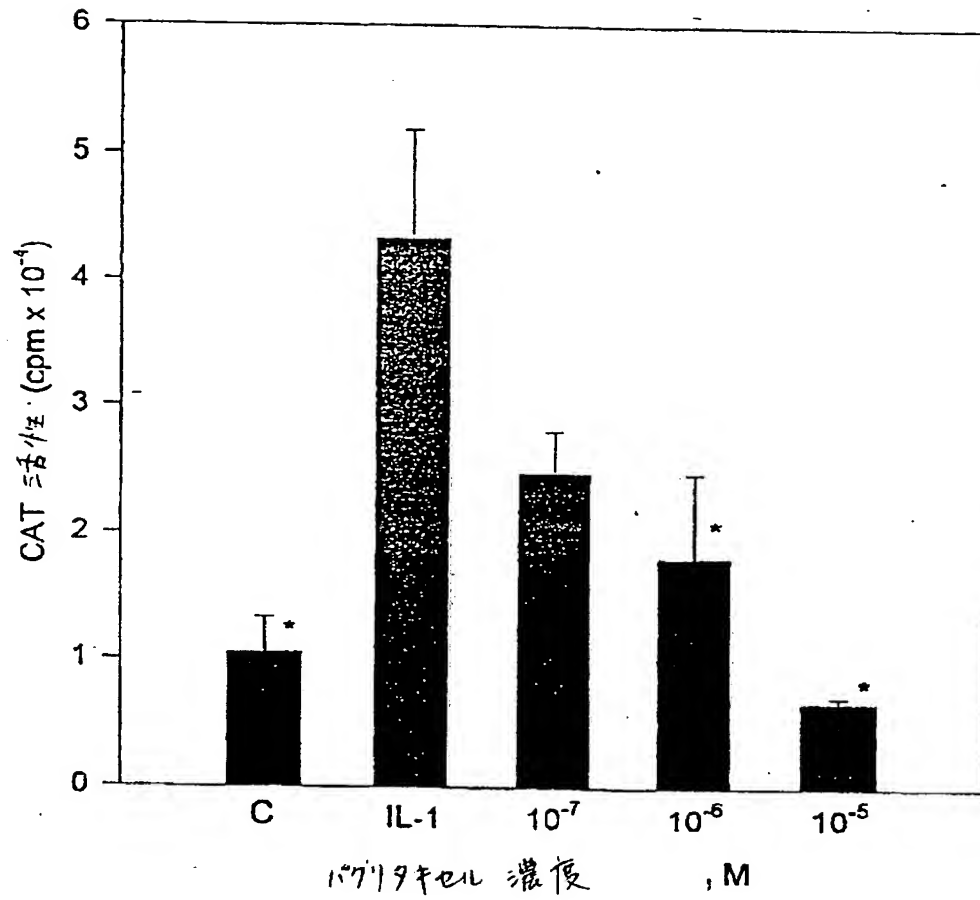
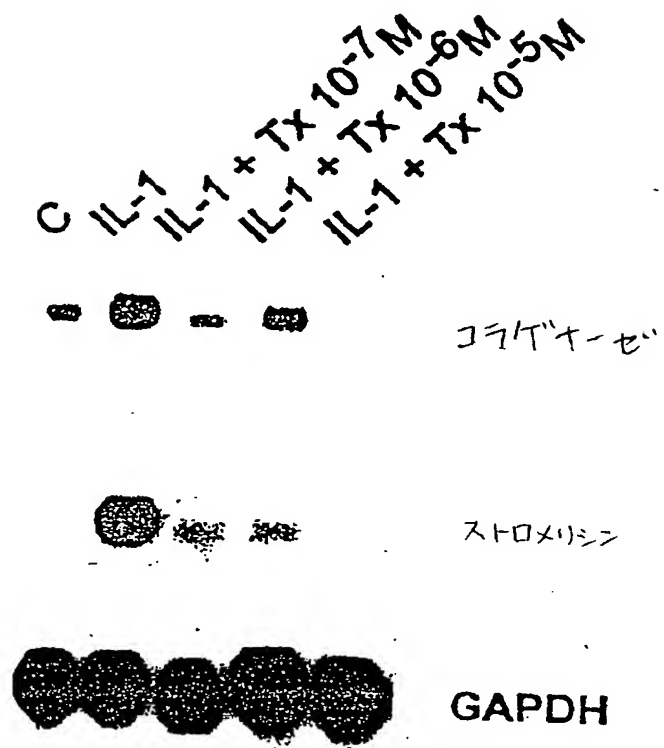


FIGURE 19C



【図20】

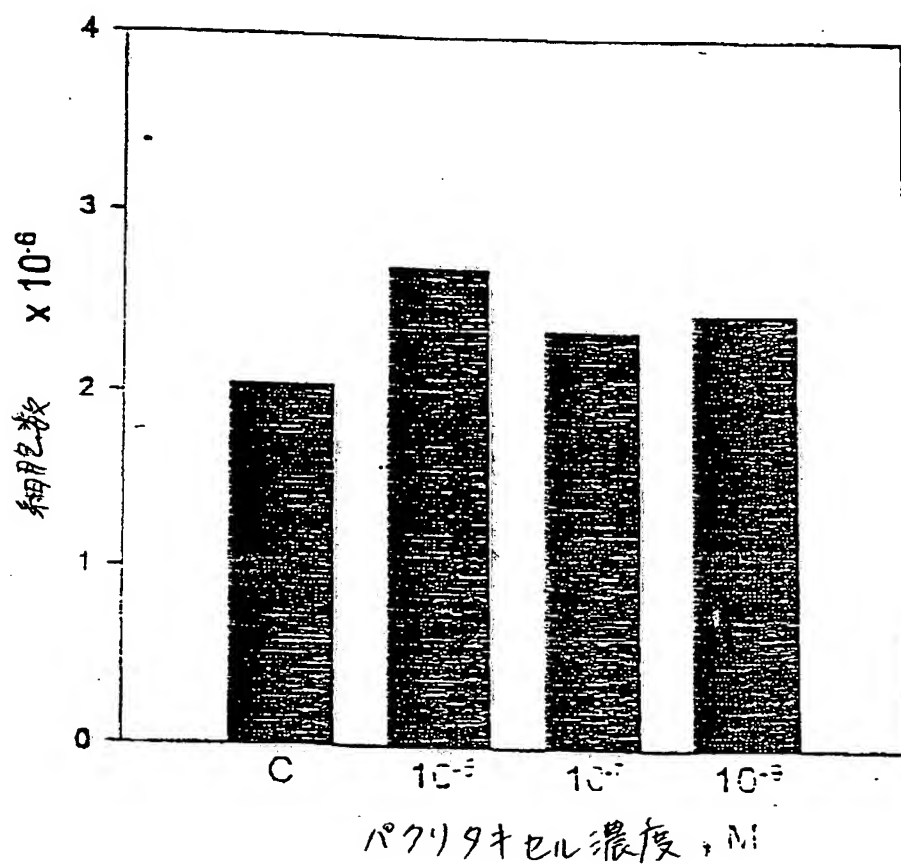
FIGURE 20



【図21】

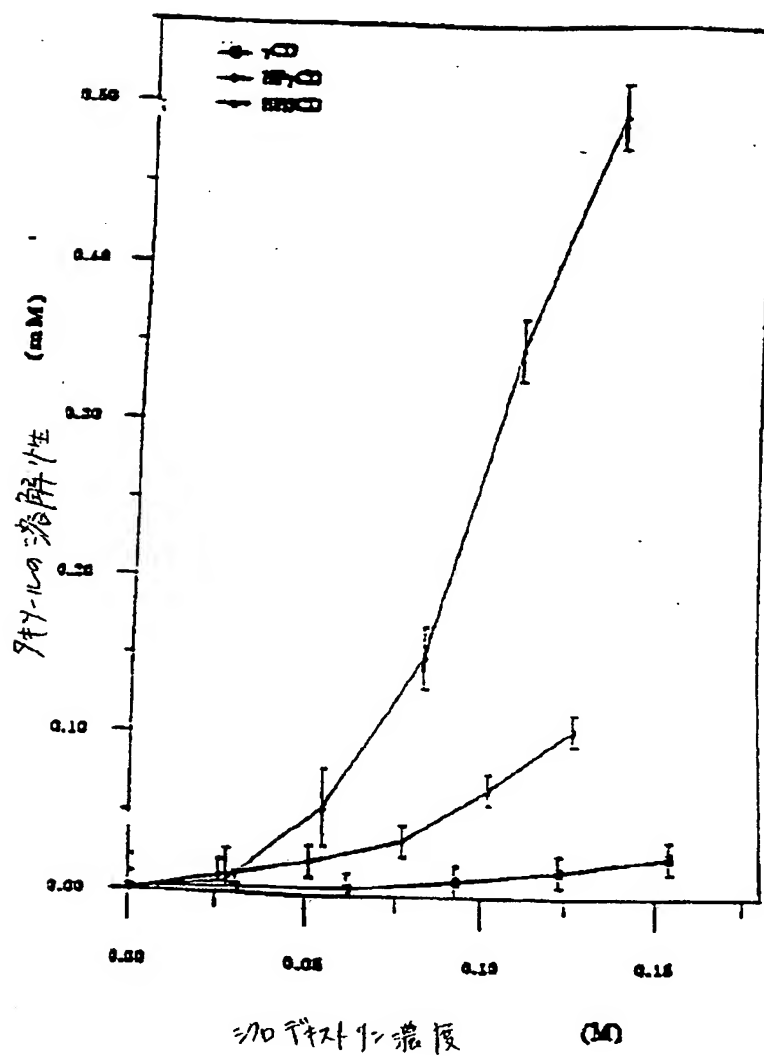
FIGURE 21

インビトロでの正常  
の生存におけるパクリタキセルの効果



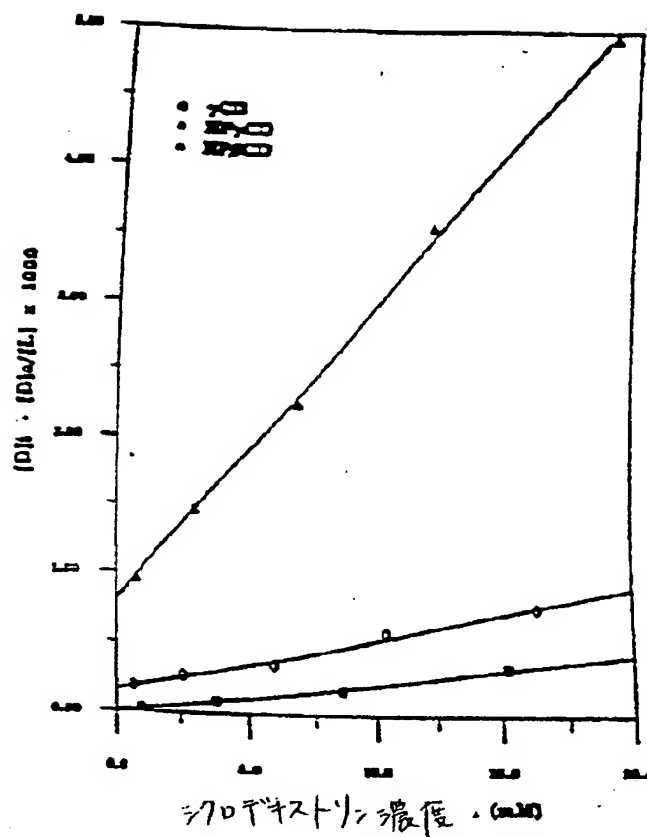
【図22】

FIGURE 22



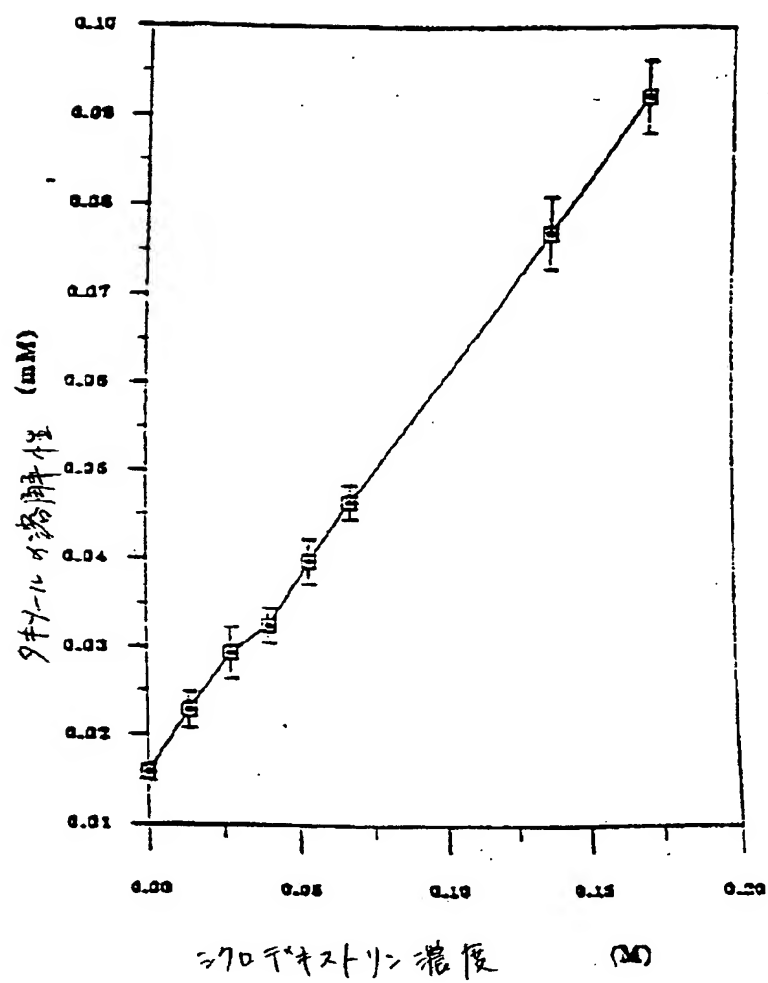
【図23】

FIGURE 23



【図24】

FIGURE 24



【図25】

FIGURE 25

PDLLA-PEG-PDLLAの

溶解温度、エタノール、10%量 (M<sub>n</sub>)、9%分散性(M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>)、所収固相の粘度、([η])

PDLLA-PEG-PDLLA PEG濃度	溶解 温度: °C	ΔH°, J/g	M <sub>n</sub> <sup>a</sup> , ×10 <sup>4</sup>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> <sup>b</sup>	[η] <sup>c</sup> , dL/g
100%	61.3	184.3	0.3 <sup>d</sup>	—	—
70%	50.2	72.2	2.1	1.21	0.27 ±
40%	46.3	42.3	4.5	3.5	0.29
30%	不溶	不溶	5.9	2.95	1.0
20%	不溶	不溶	5.1	2.96	1.45
10%	不溶	不溶	11	2.38	1.5
7%γ-ブチ	21.2	59.3	—	—	—
20% γ-ブチル 充填	212.1	5.6	—	—	—
コポリマー (50%PEG)					

a: DSC (1-5) 測定。

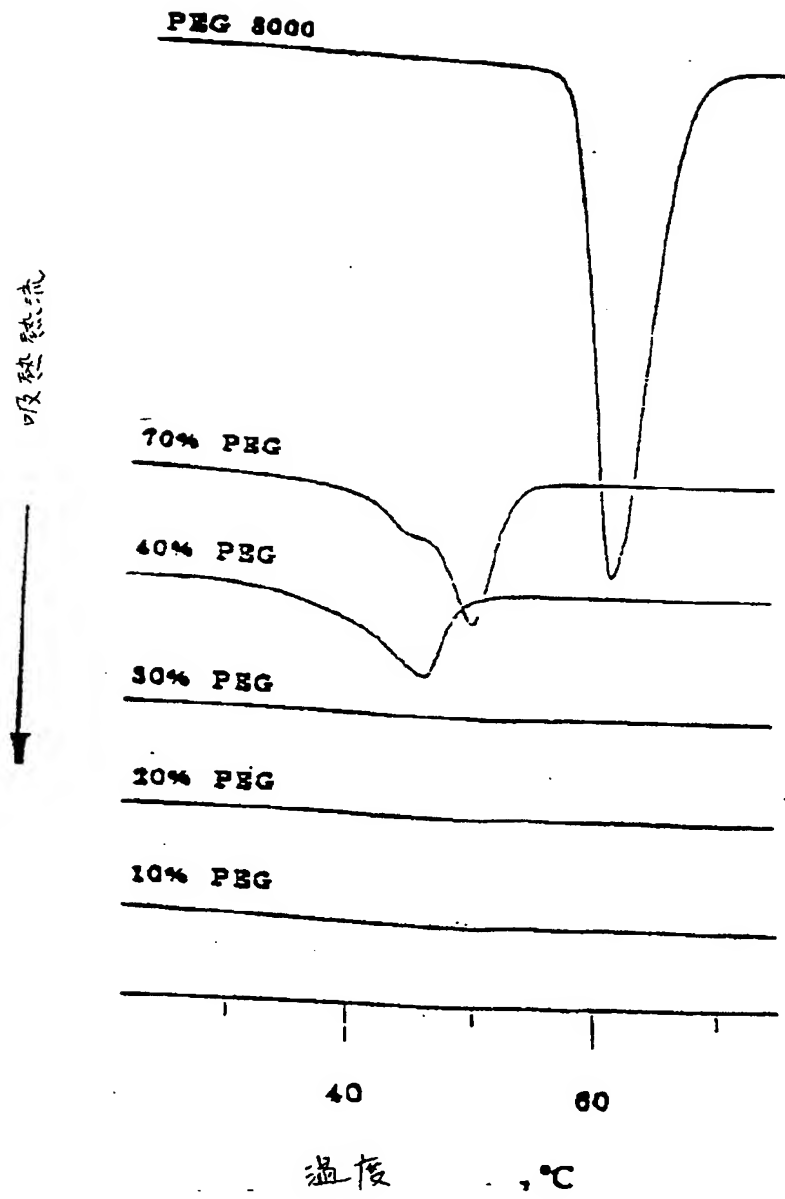
b: GPC (1-5) 測定。ポリスチレン標準と比較。

c: CHCl<sub>3</sub> 中 25°C で。

d: 製造業者 (1-5) 提供データ。

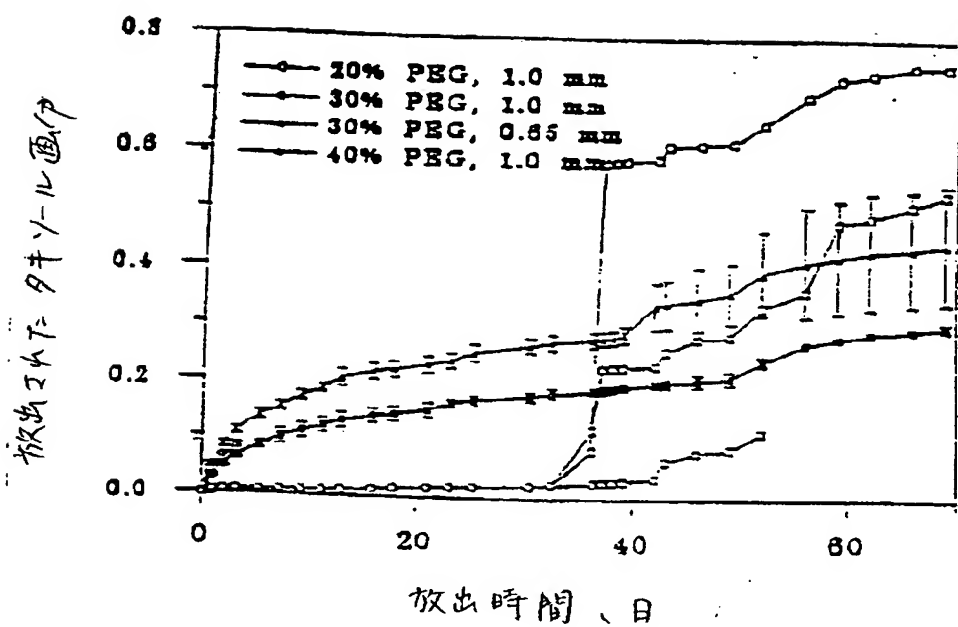
【图26】

FIGURE 26



【図27】

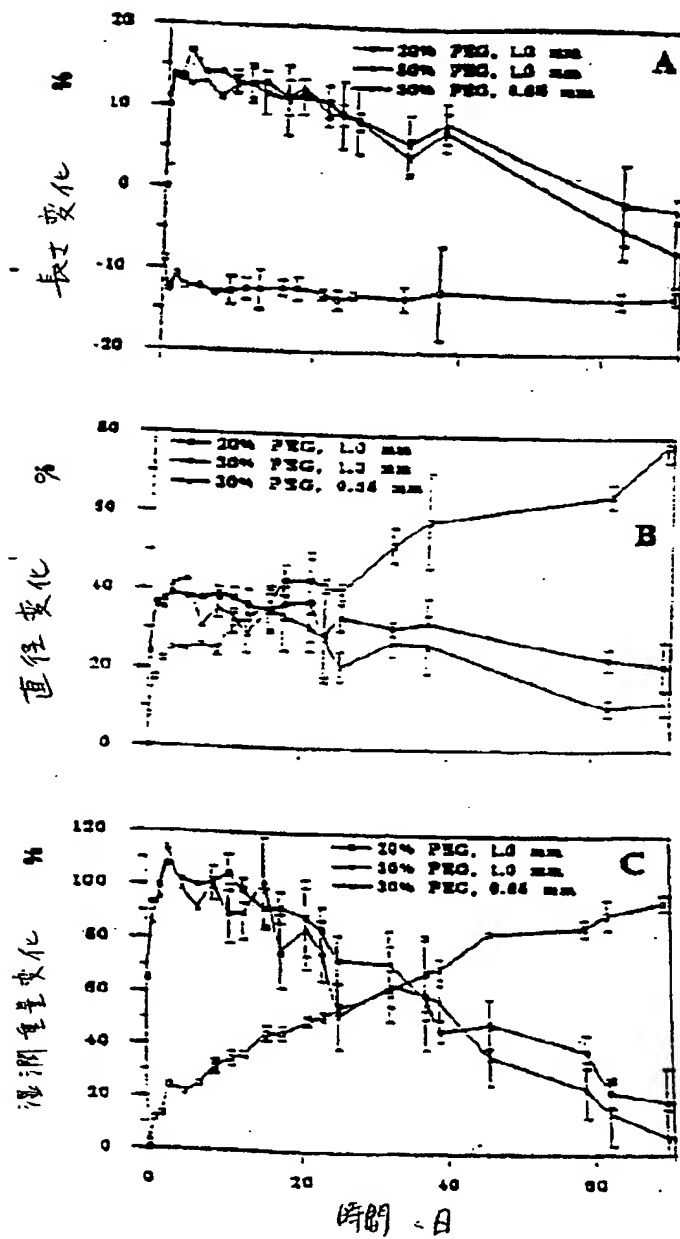
FIGURE 27





【図28】

FIGURE 28A-28C



【図29】

## FIGURE 29

37℃でのPBSアルブミン緩衝液中への放出の間のPDLLA-PEG-PDLLA  
シリンダー(20%タキール®で充填された)の質量損失およびポリマー組成変化

°C				
ゲル <sup>a</sup>	時間、日	乾燥重量損失、%	1.65/5.1 <sup>b</sup>	3.6/5.1 <sup>b</sup>
20% PEG-1mm	0	0	1.51	1.65
20% PEG-1mm	32	7.9	—	—
20% PEG-1mm	69	19.2	1.65	0.68
30% PEG-1mm	0	0	1.59	1.91
30% PEG-1mm	32	23.9	—	—
30% PEG-1mm	69	45.5	4.3	0.56
30% PEG-0.65mm	0	0	1.59	1.91
30% PEG-0.65mm	32	26.7	—	—
30% PEG-0.65mm	69	57.5	5.3	0.21

a: PDLLA-PEG-PDLLAコポリマーシリンダー (PEG含量およびシリンダーの直径を示す)

b: CDCL<sub>3</sub> 中の<sup>1</sup>H-NMRによって測定する; 1.65/5.1は、1.65ppm

(PDLLA中の-CHCH<sub>3</sub>-に起因する)でのピーク面積と、5.1ppm (PDLLA中の

-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-に起因する)でのピーク面積との比を示す; 3.6/5.1は、3.6ppm

(PEG中の-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-に起因する)でのピーク面積と5.1ppmでのピーク面積との比を示す。

【图30】

FIGURE 30

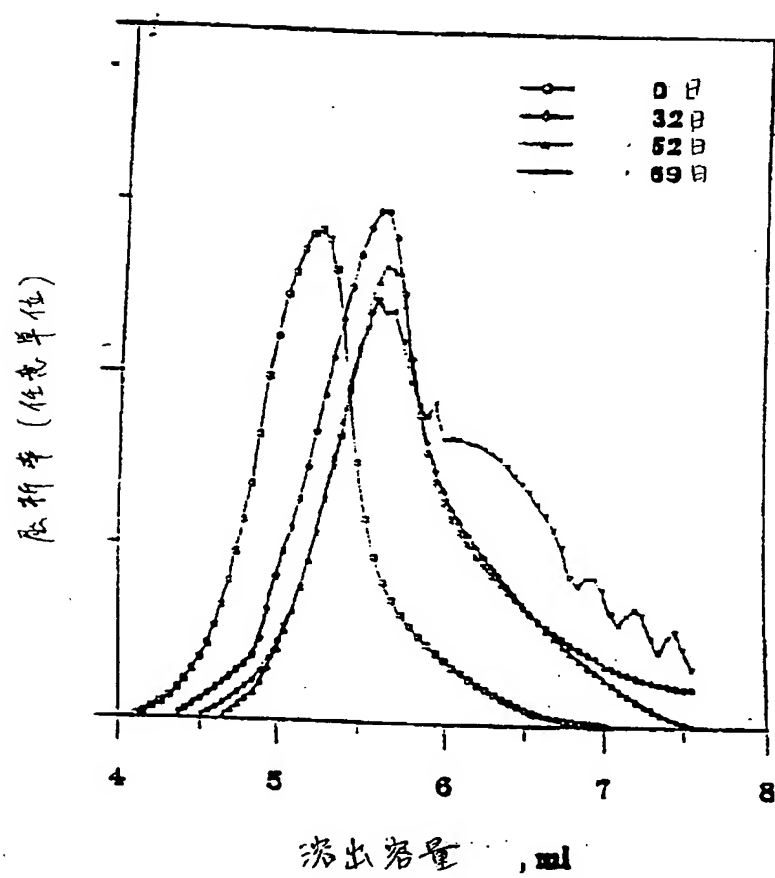
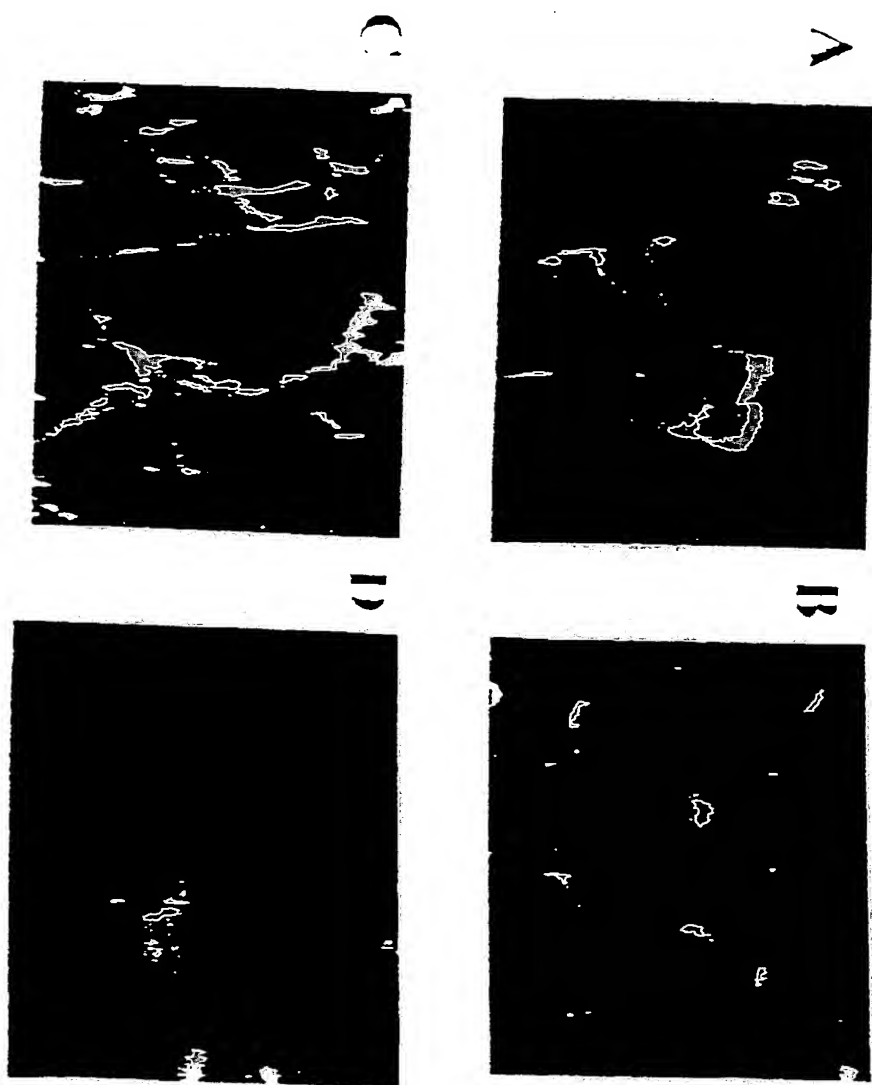


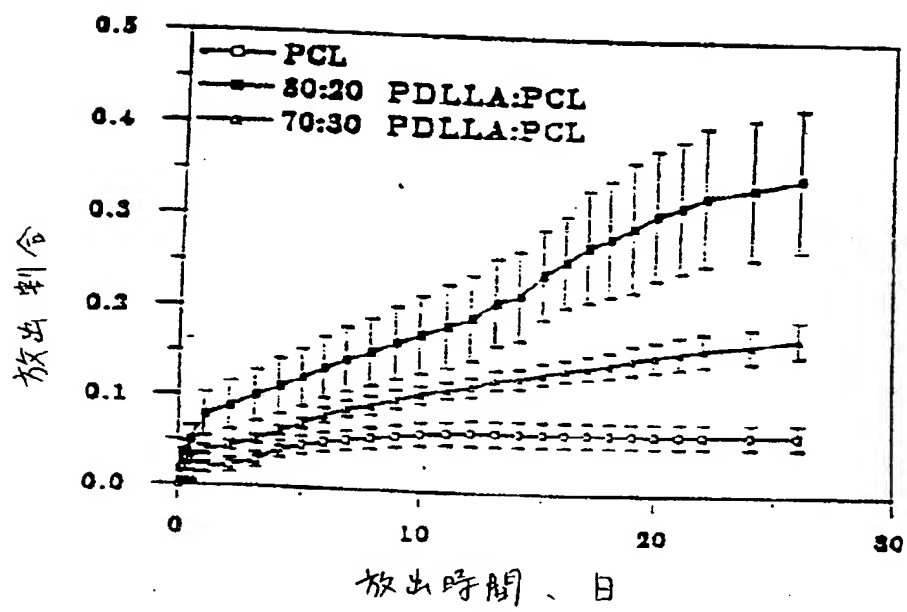
FIGURE 31



【図31】

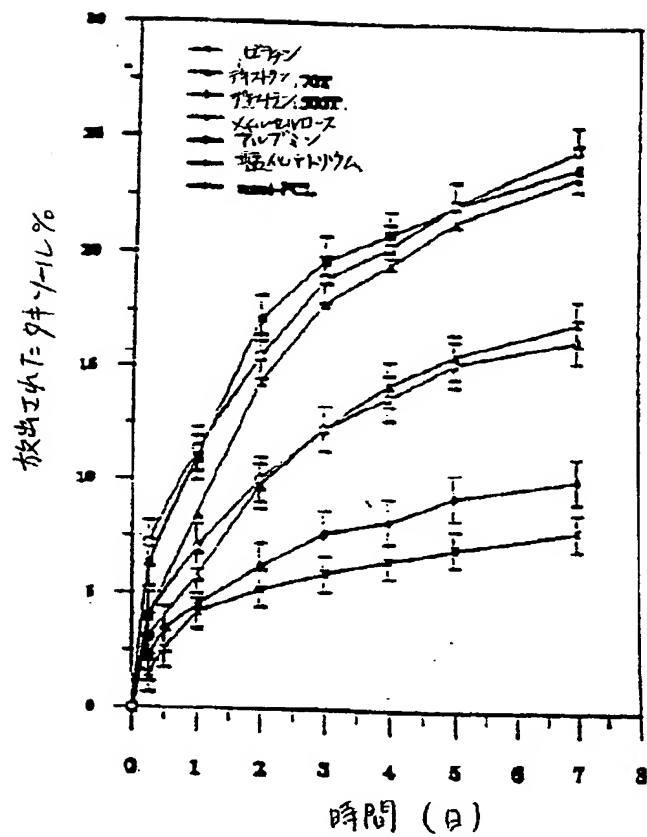
【図32】

FIGURE 32



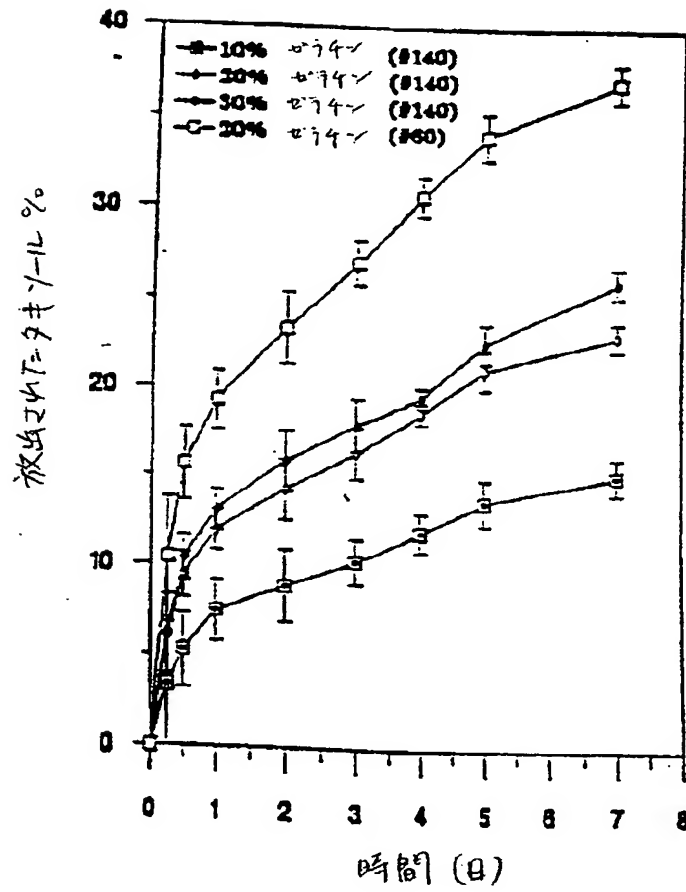
【図33】

FIGURE 33



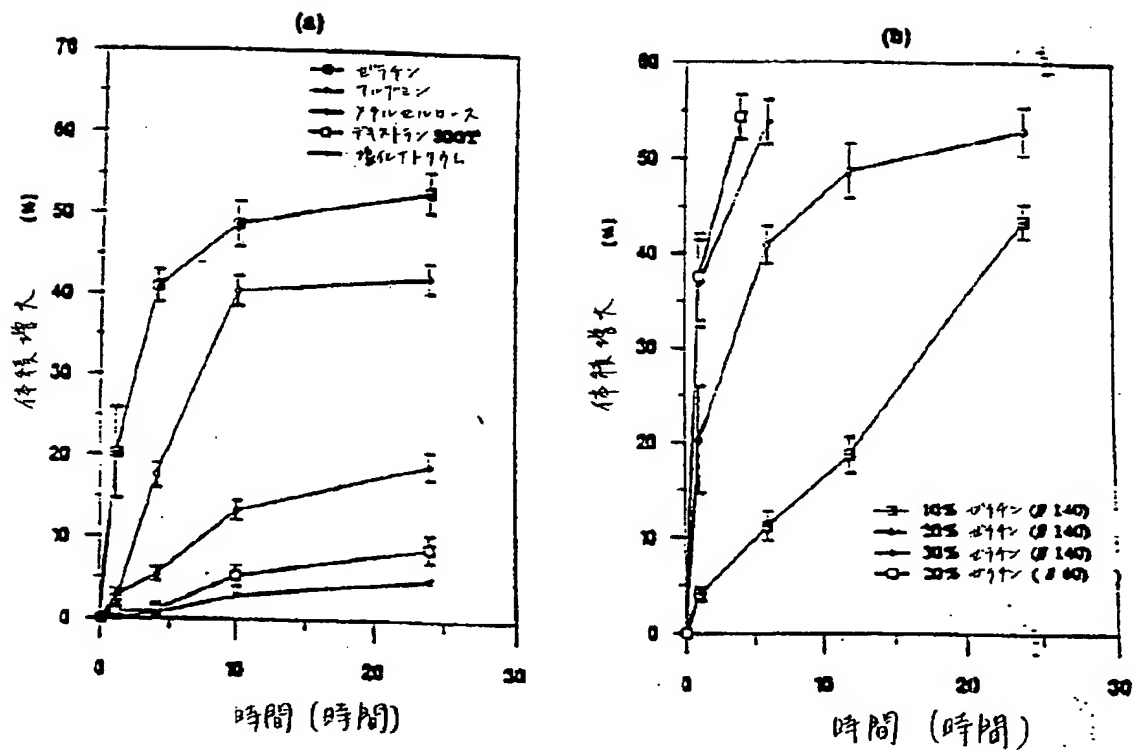
【図34】

FIGURE 34



【図35】

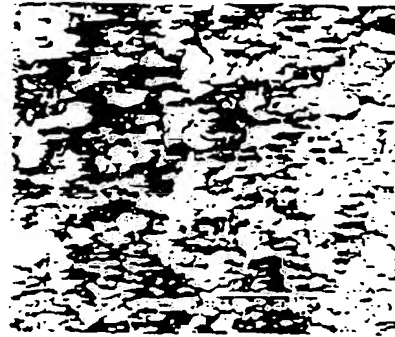
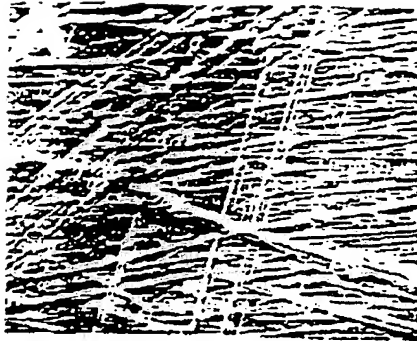
FIGURE 35





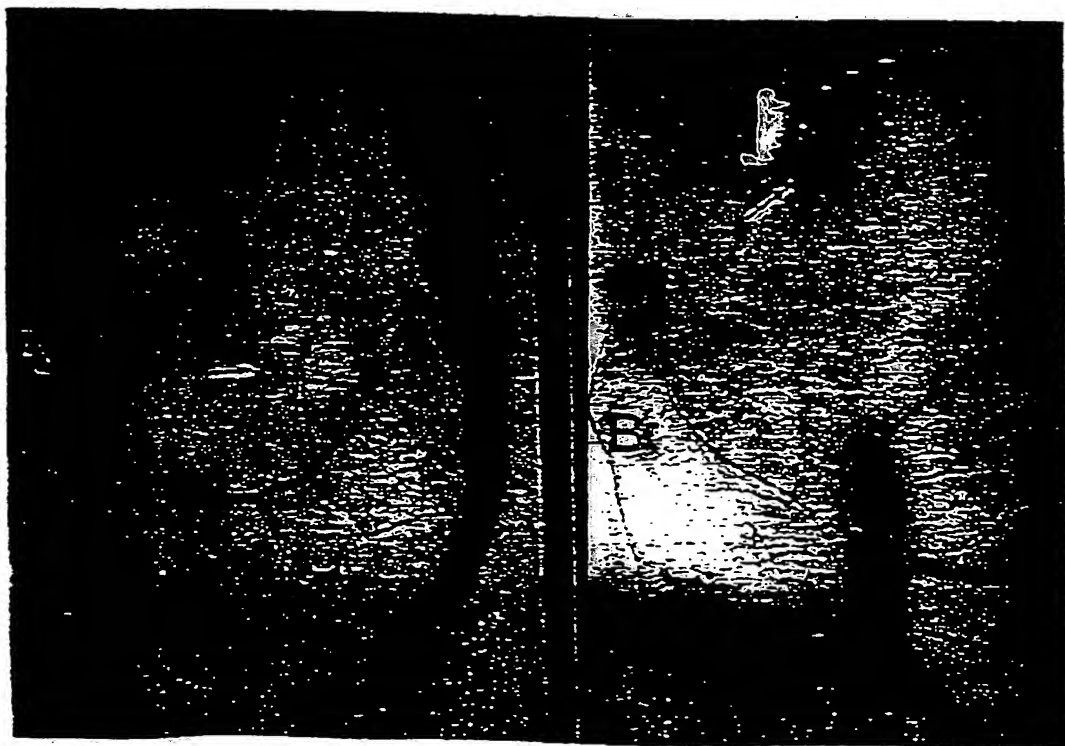
【図36】

FIGURE 36A-36D



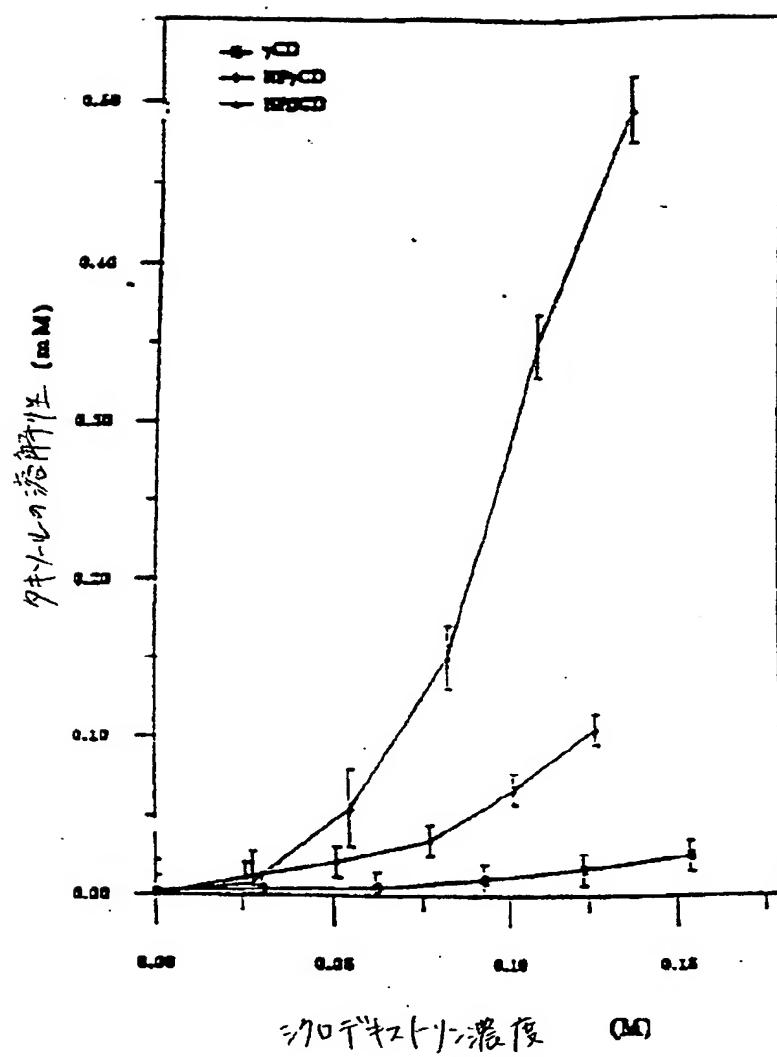
【図37】

FIGURE 37A-37B



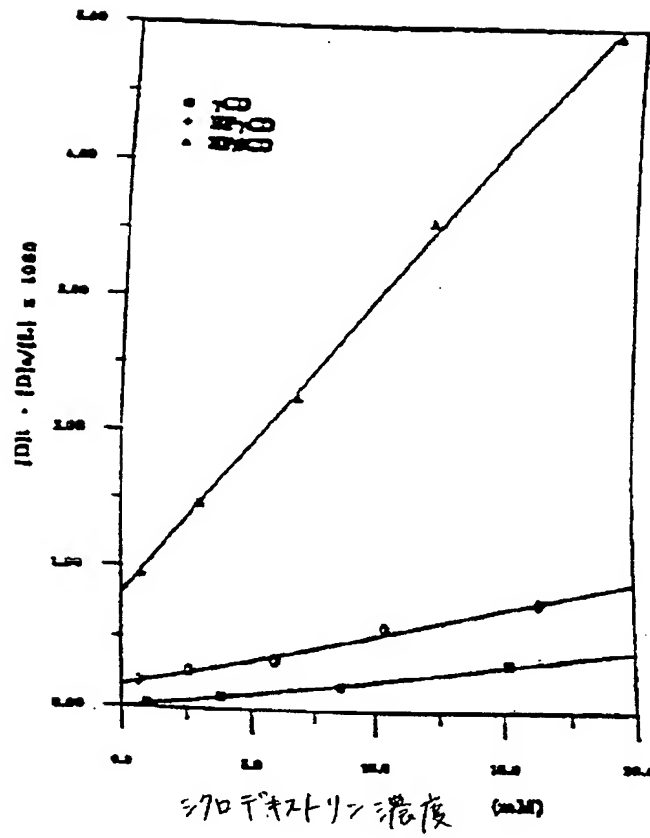
【図38】

FIGURE 38



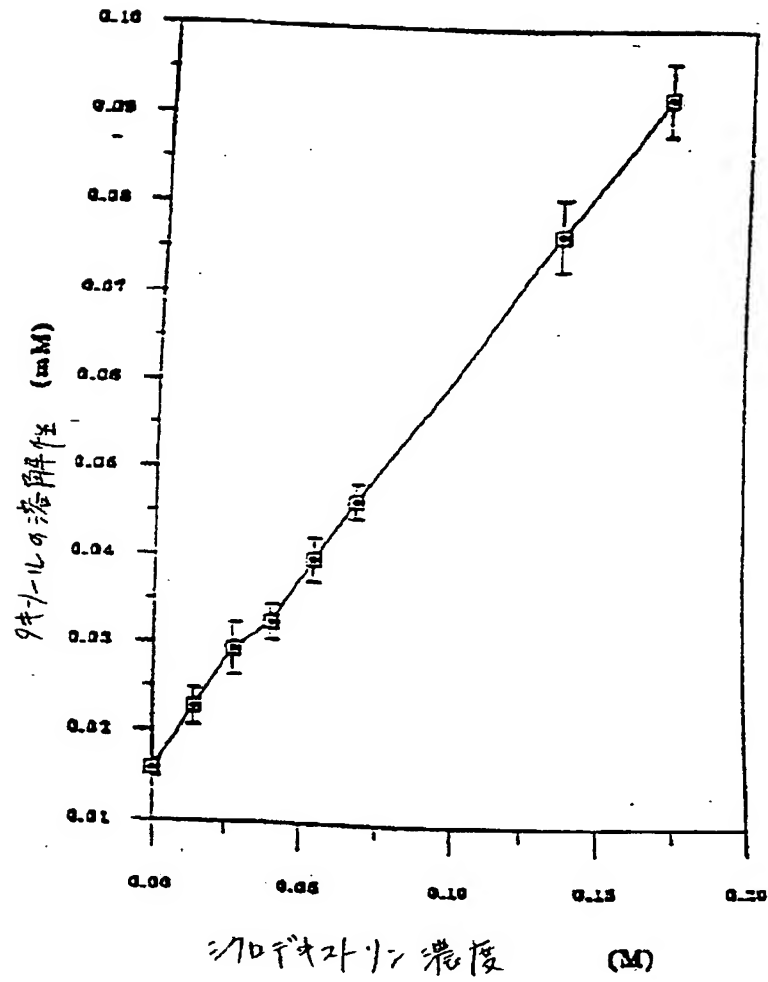
【図39】

FIGURE 39



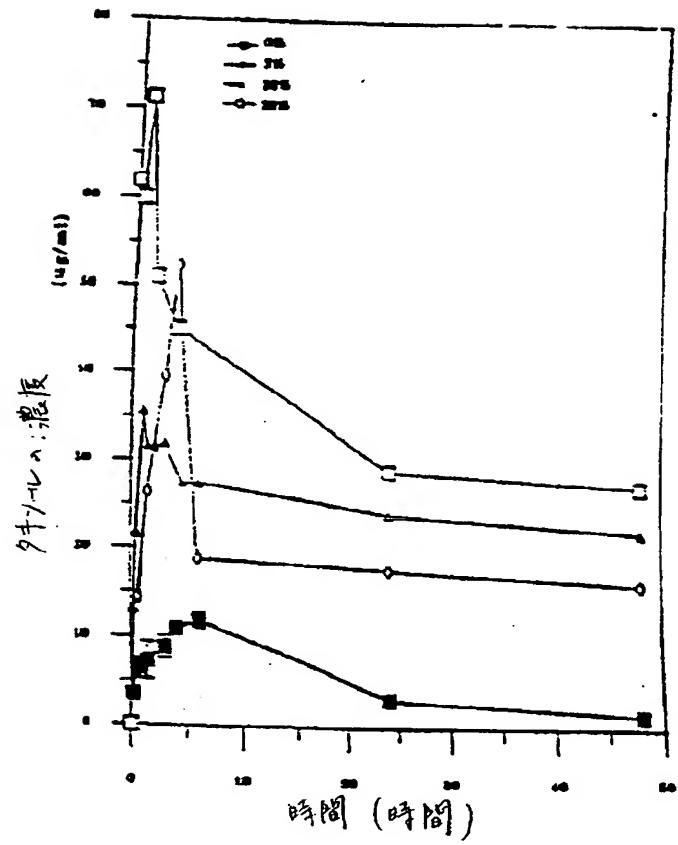
【図40】

FIGURE 40



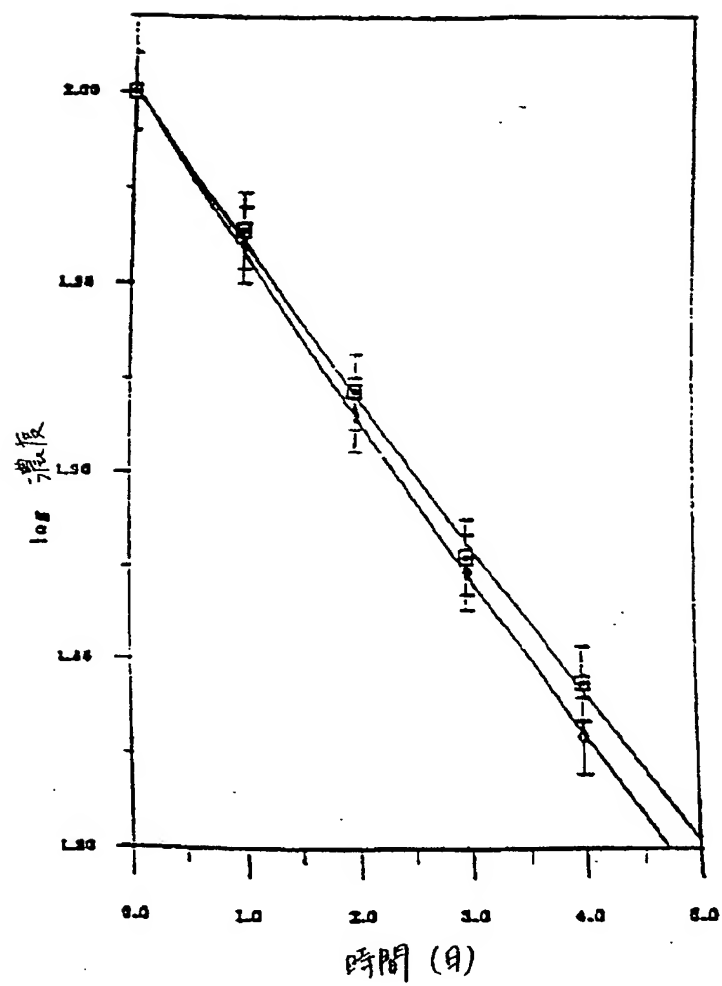
【図41】

FIGURE 41



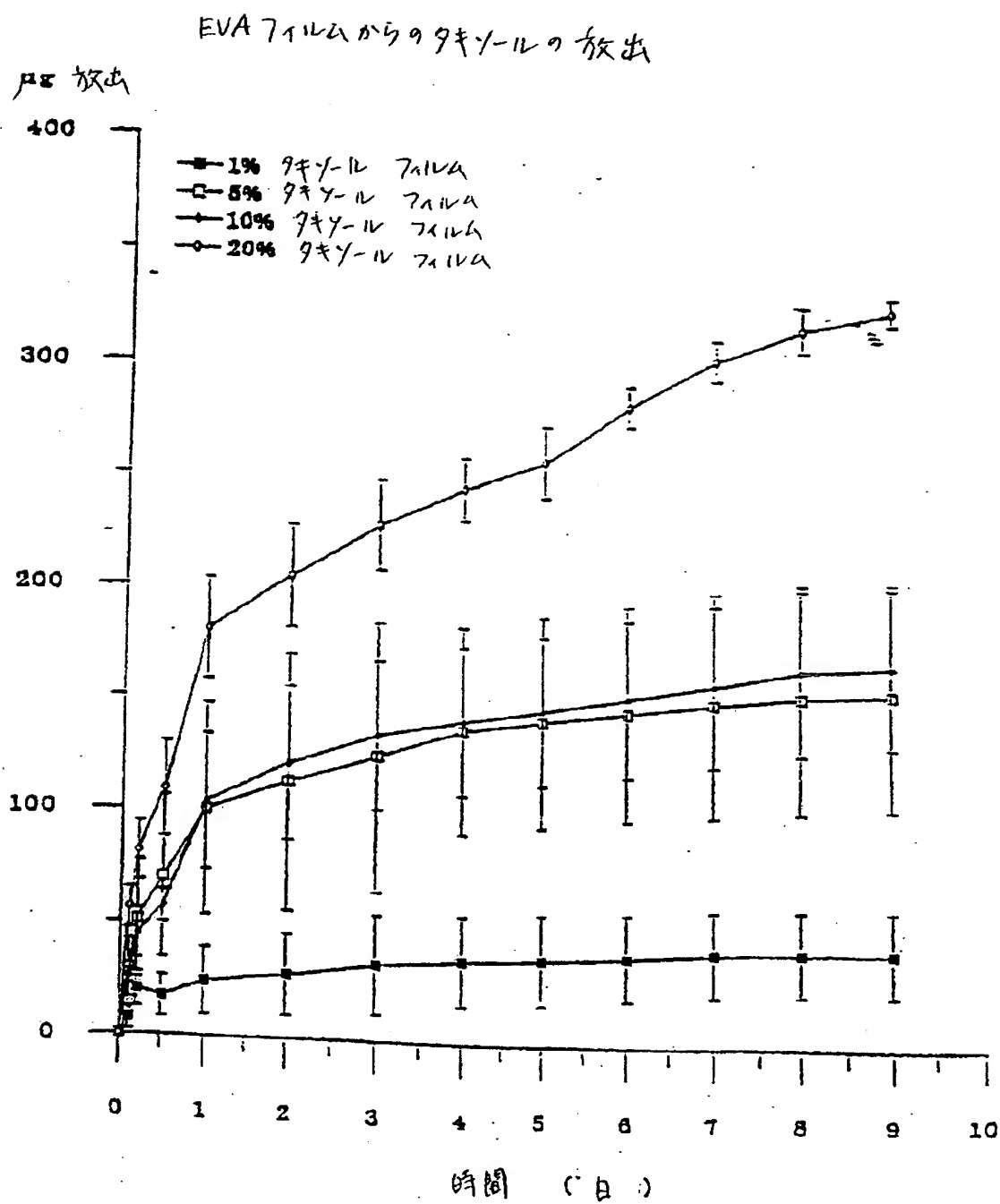
【図42】

FIGURE 42



【図43】

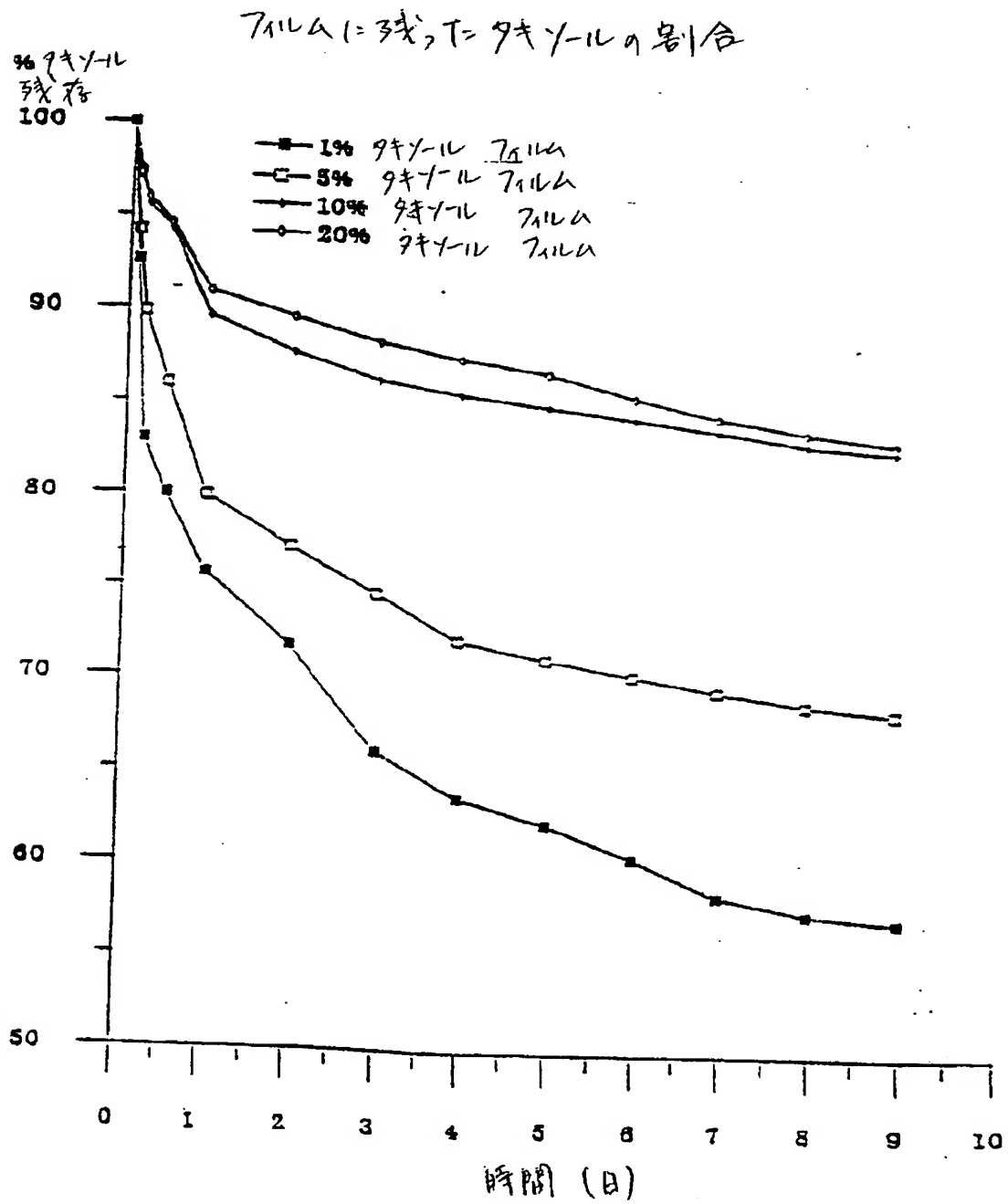
FIGURE 43A





【図43】

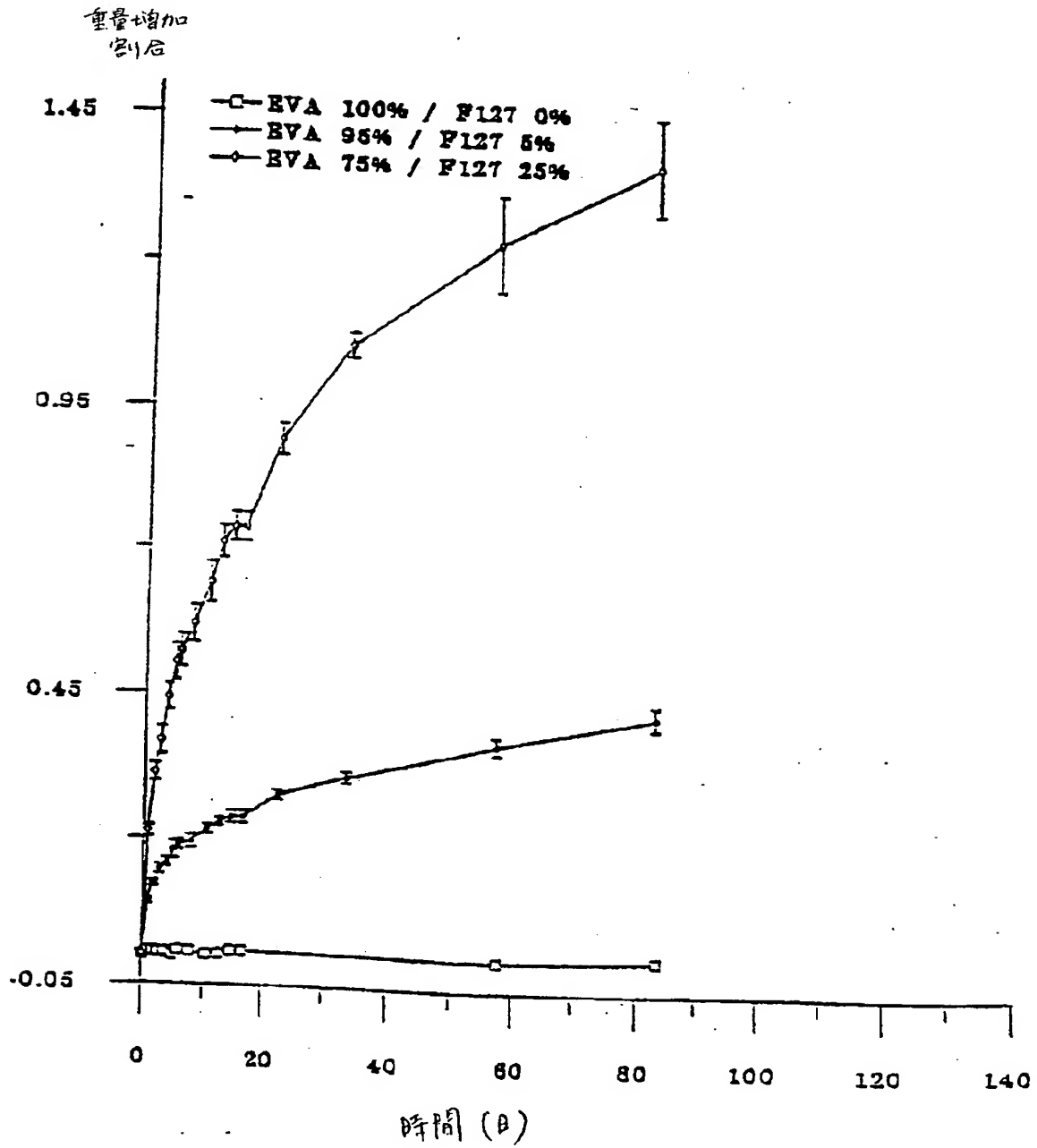
FIGURE 43B



【図43】

FIGURE 43C

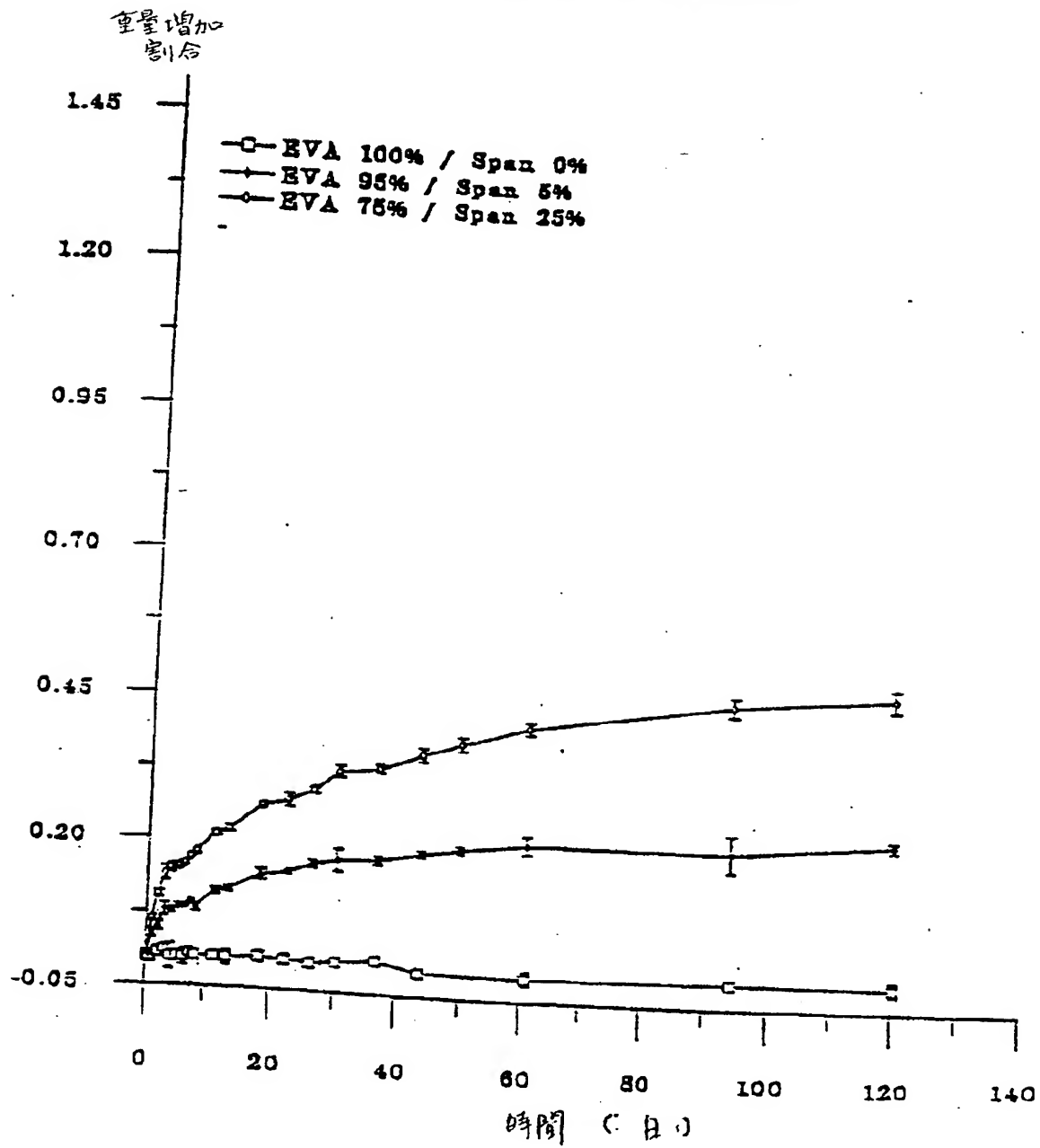
タキロール無しでの EVA / F127 フィルムの膨張率



【図43】

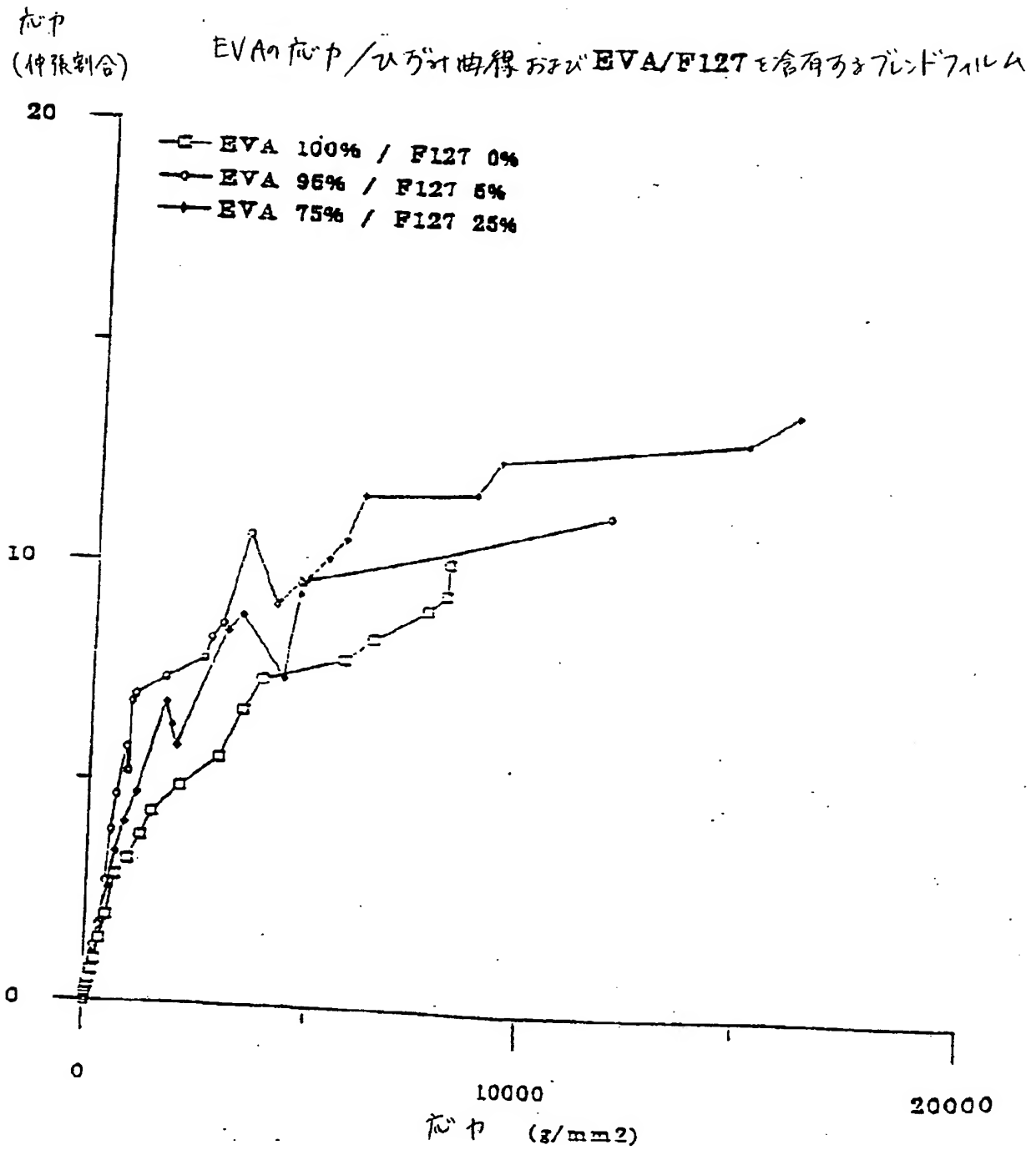
FIGURE 43D

タキリル無しでの EVA/ Span 80 フィルムの膨潤



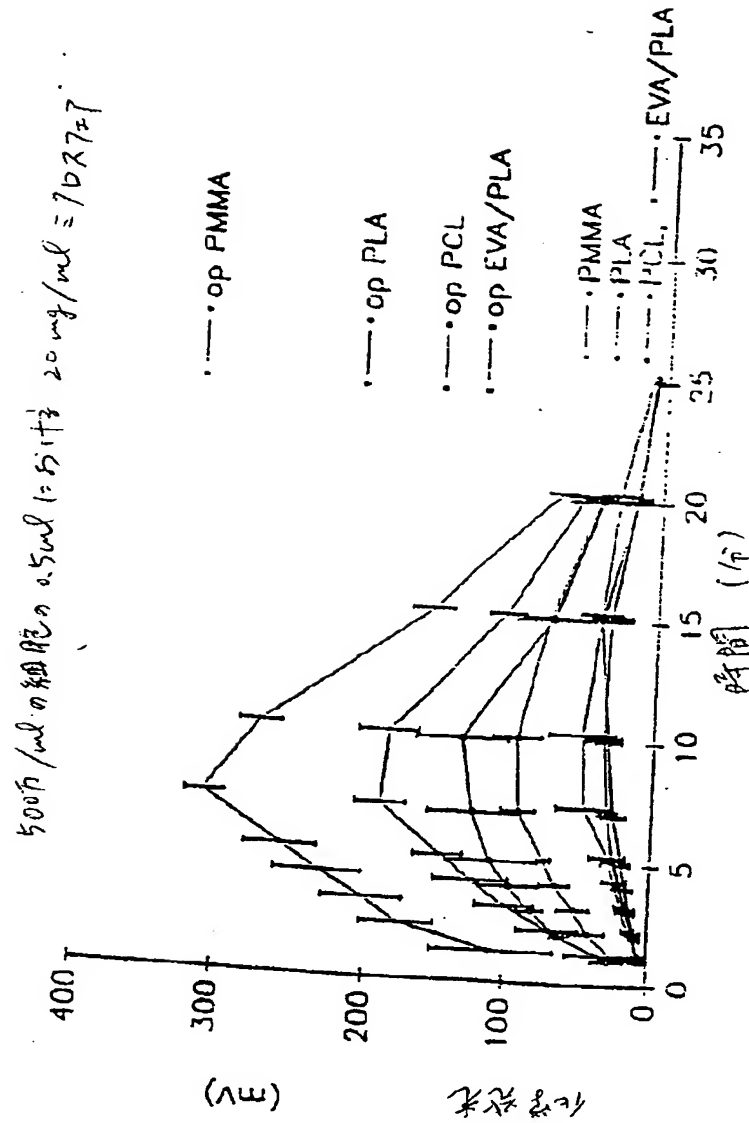
【図43】

FIGURE 43E



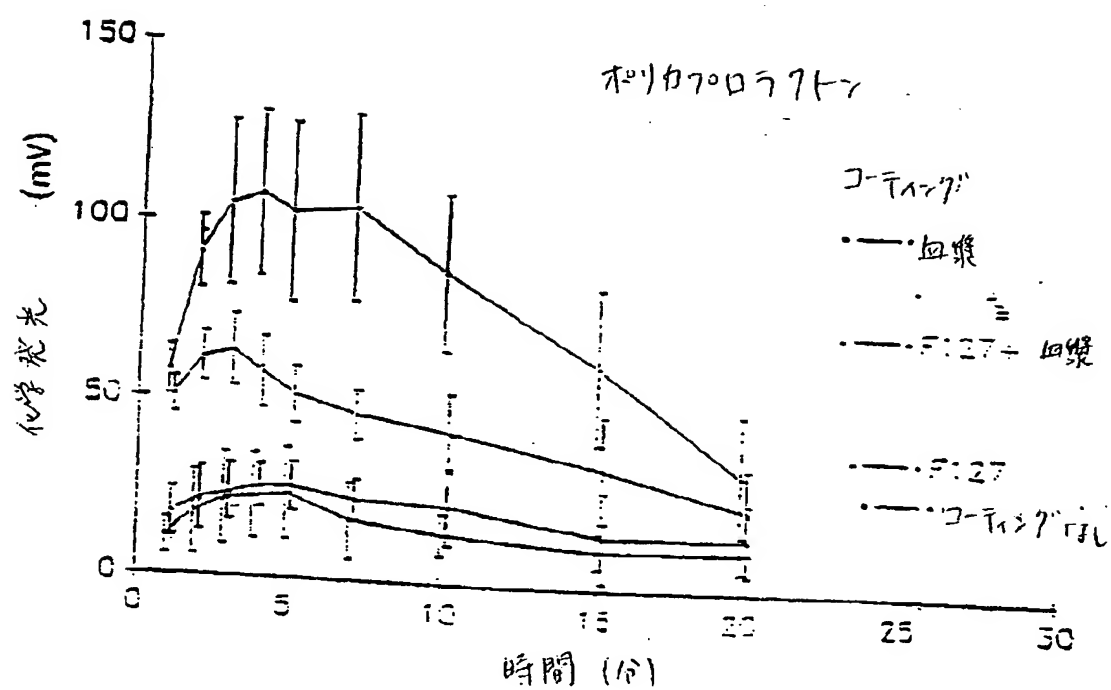
【图 44】

FIGURE 44



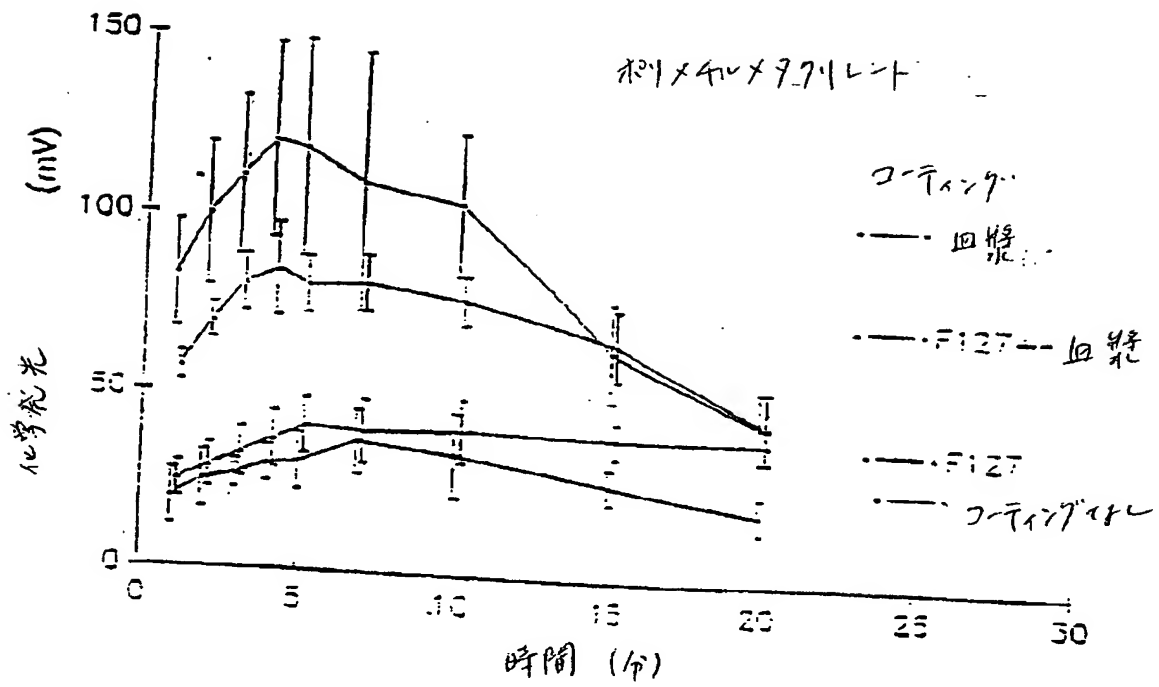
【図45】

FIGURE 45



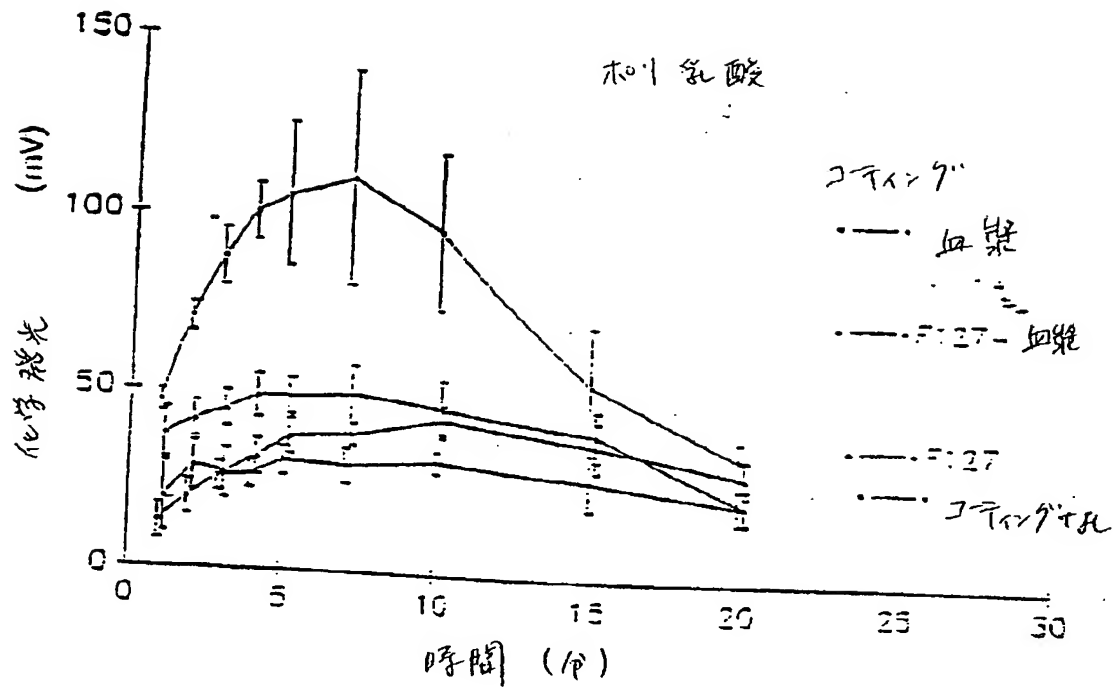
【図46】

FIGURE 46



【図47】

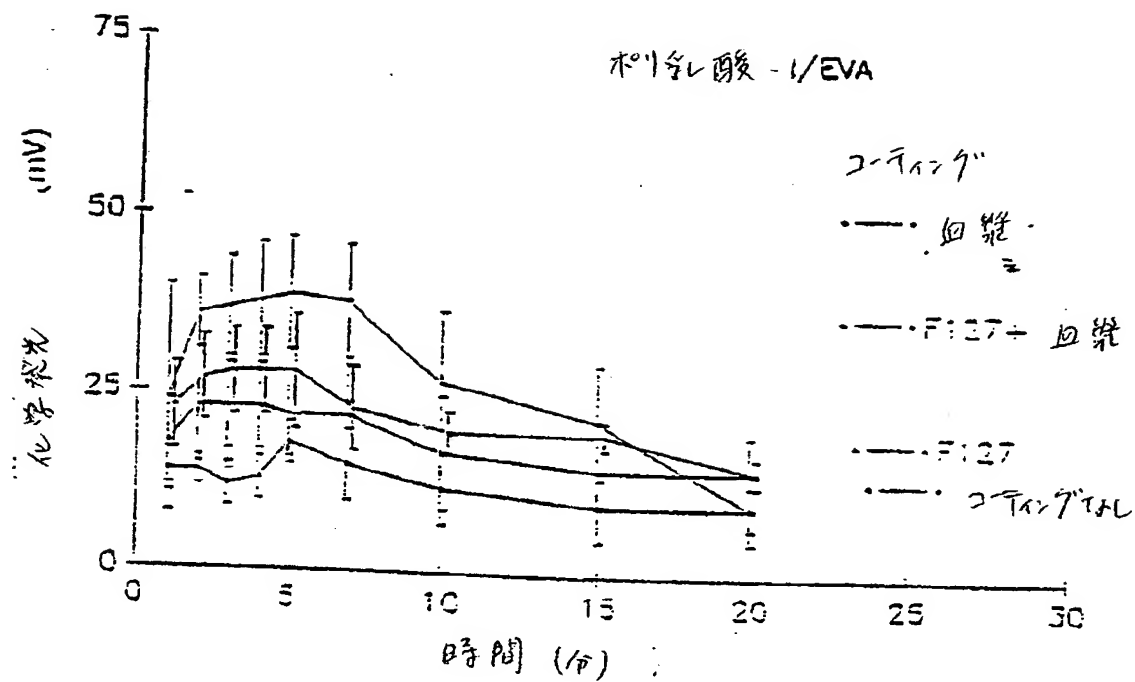
FIGURE 47





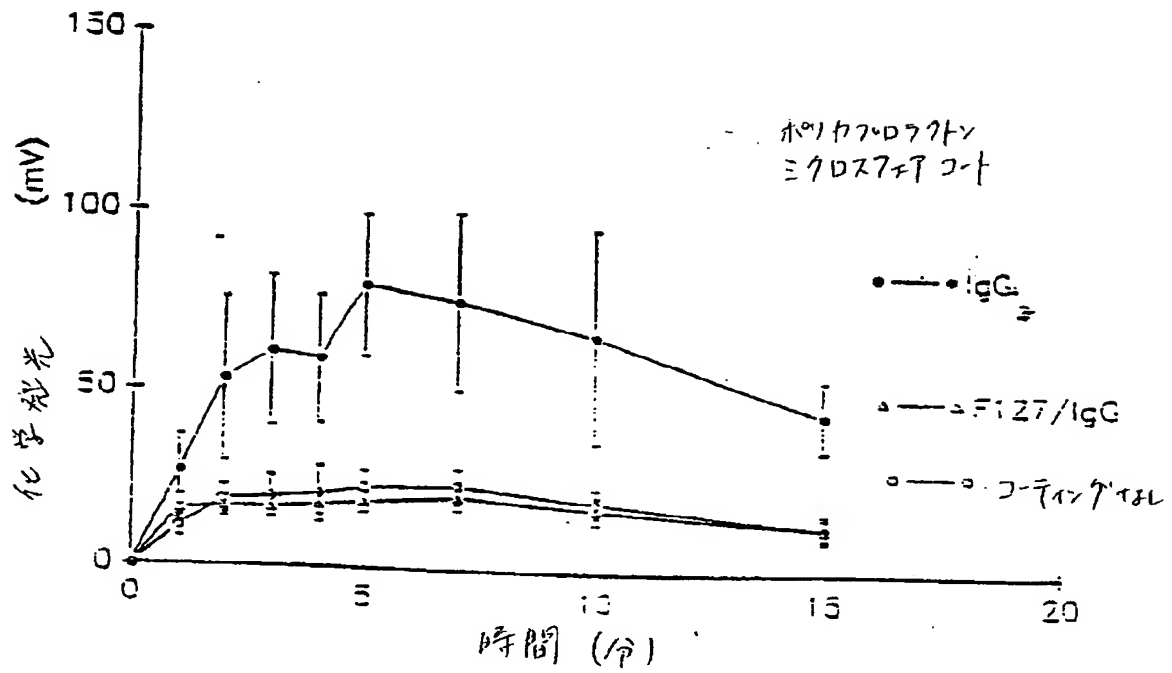
【図48】

FIGURE 48



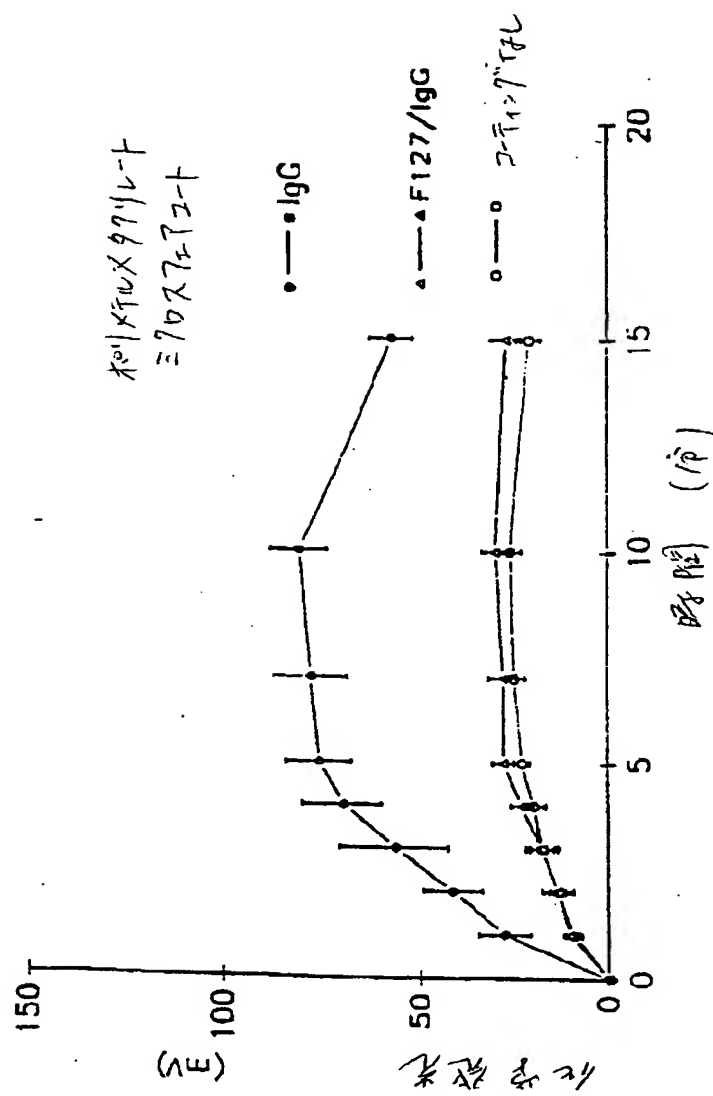
【図49】

FIGURE 49



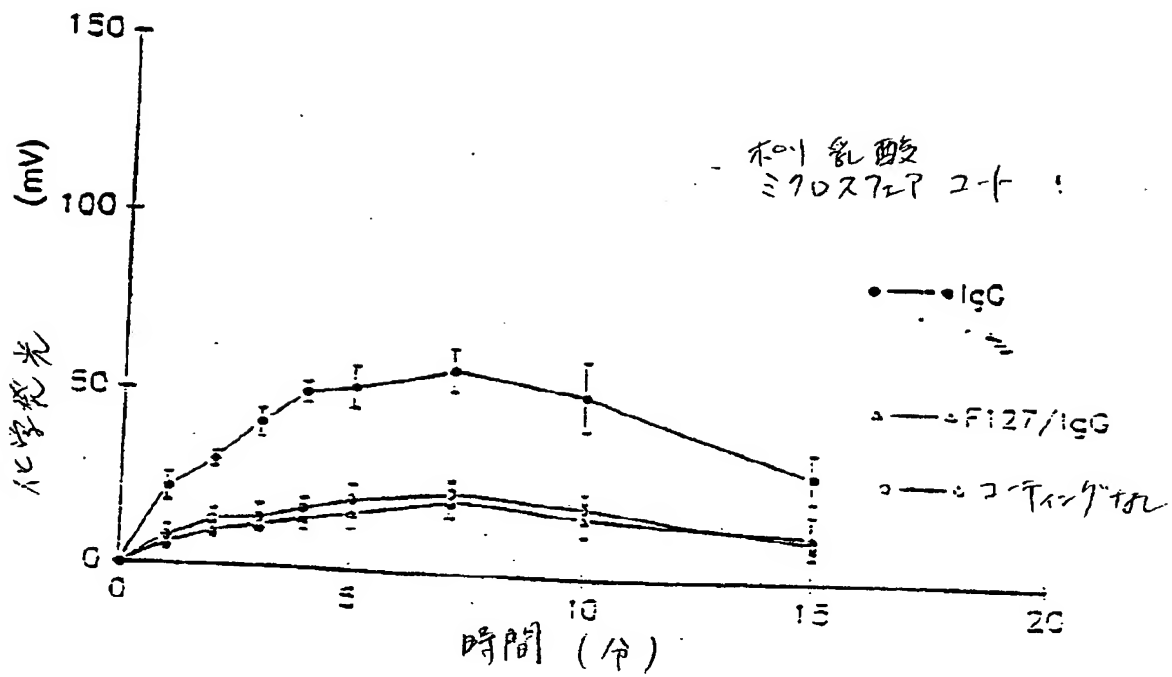
【図50】

FIGURE 50



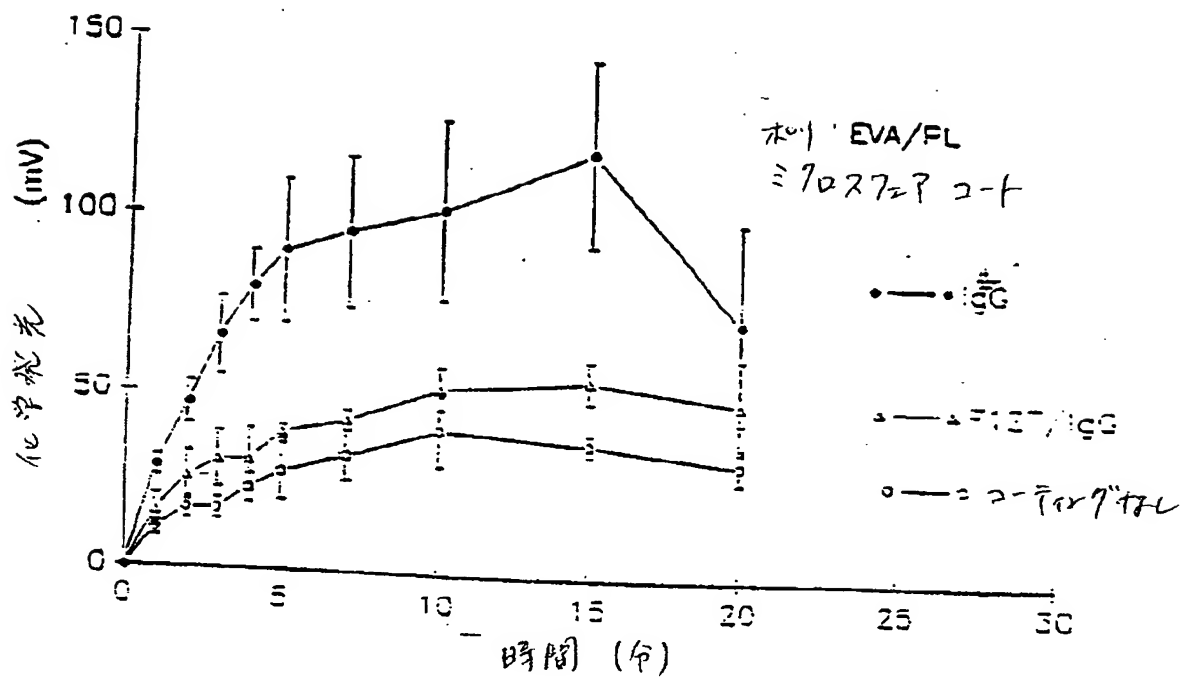
【図51】

FIGURE 51



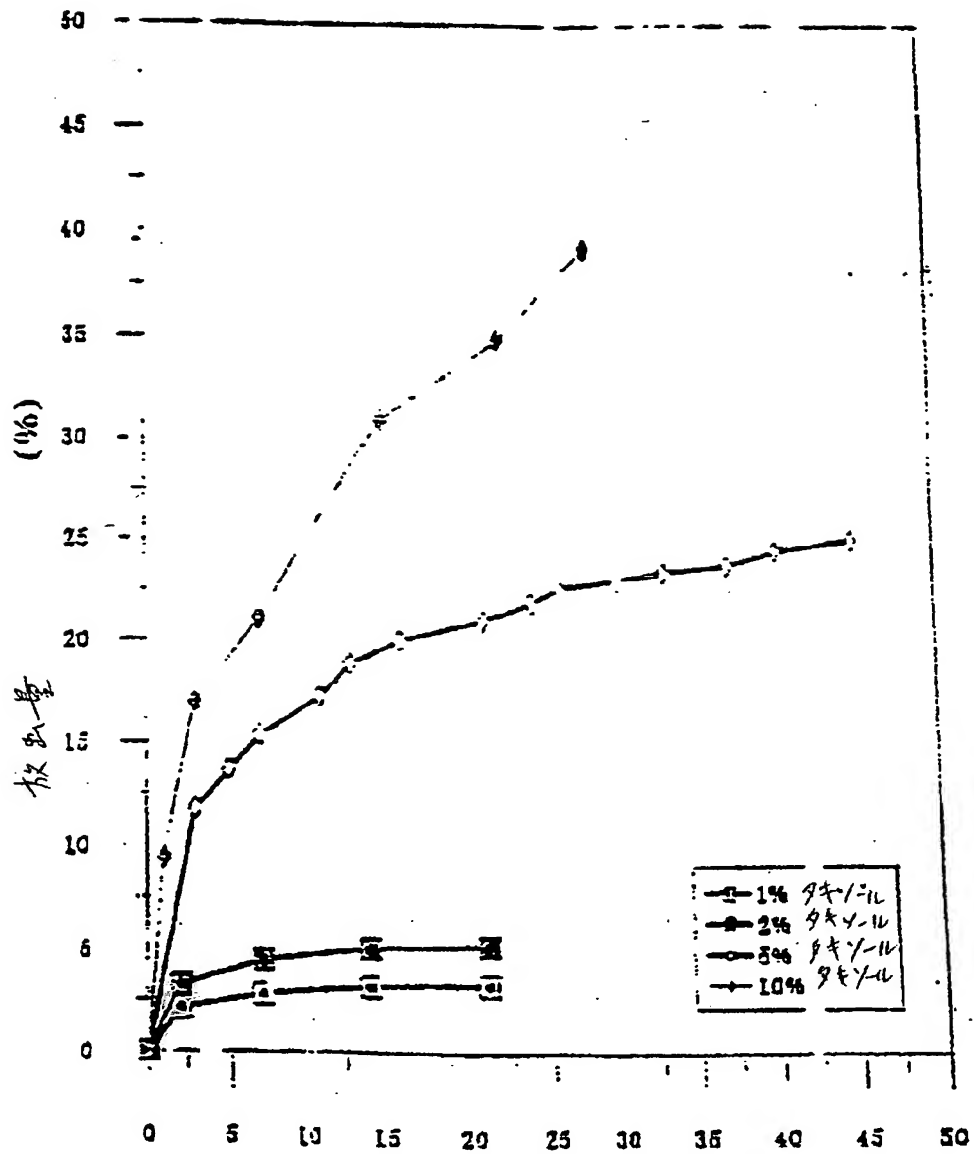
【図52】

FIGURE 52



【図53】

FIGURE 53A



【図53】

**FIGURE 53B**

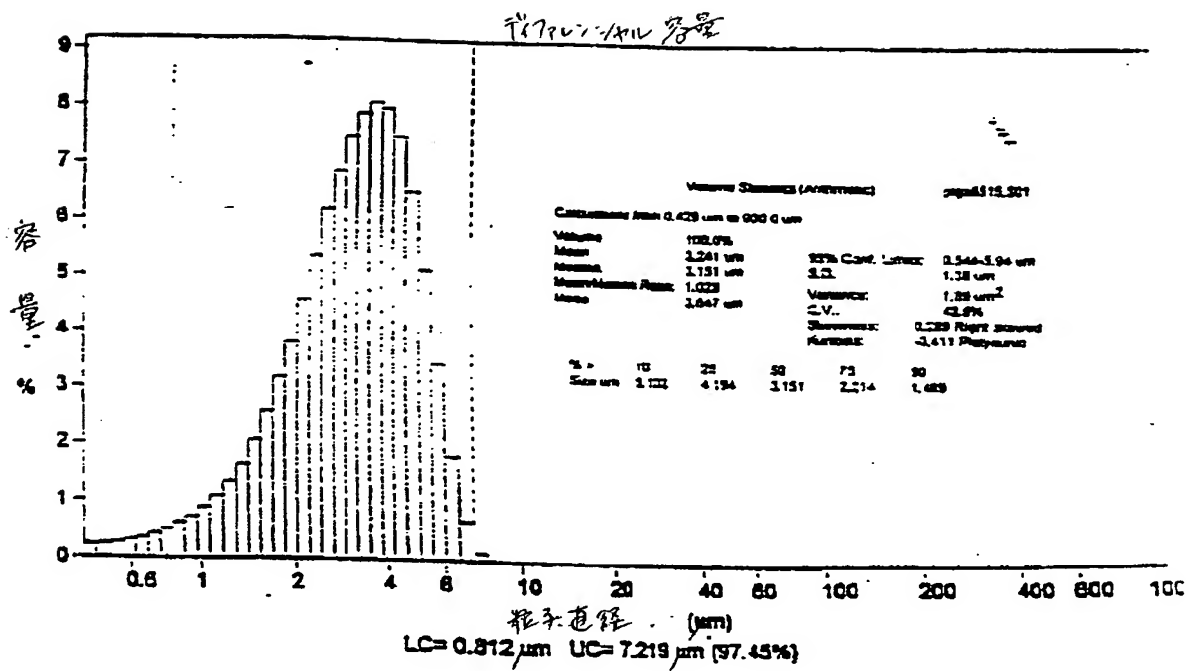


**FIGURE 53C**



【図54】

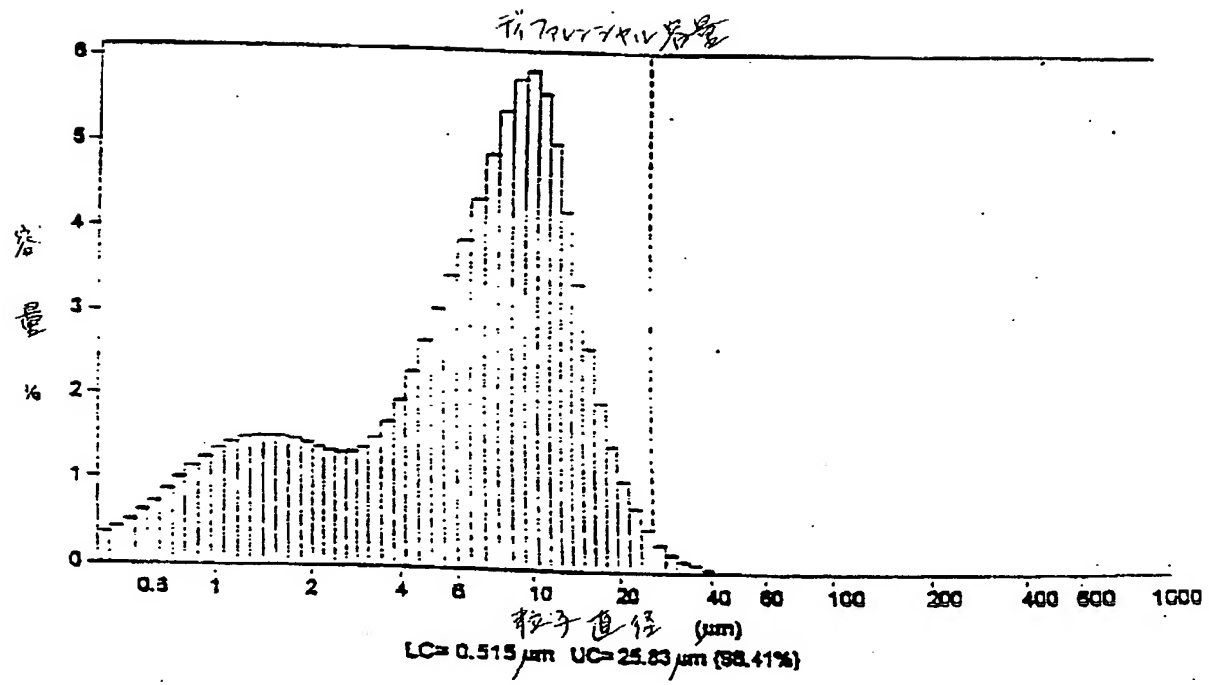
FIGURE 54





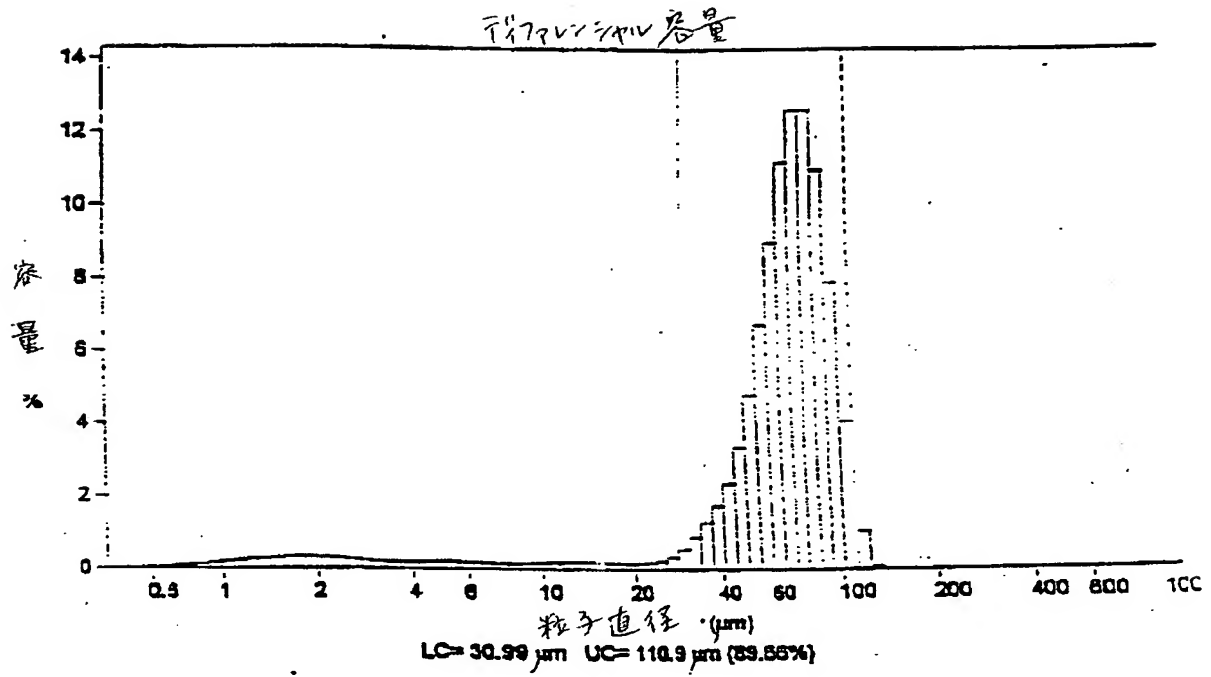
【図55】

FIGURE 55



【図56】

FIGURE 56



【図57】

FIGURE 57

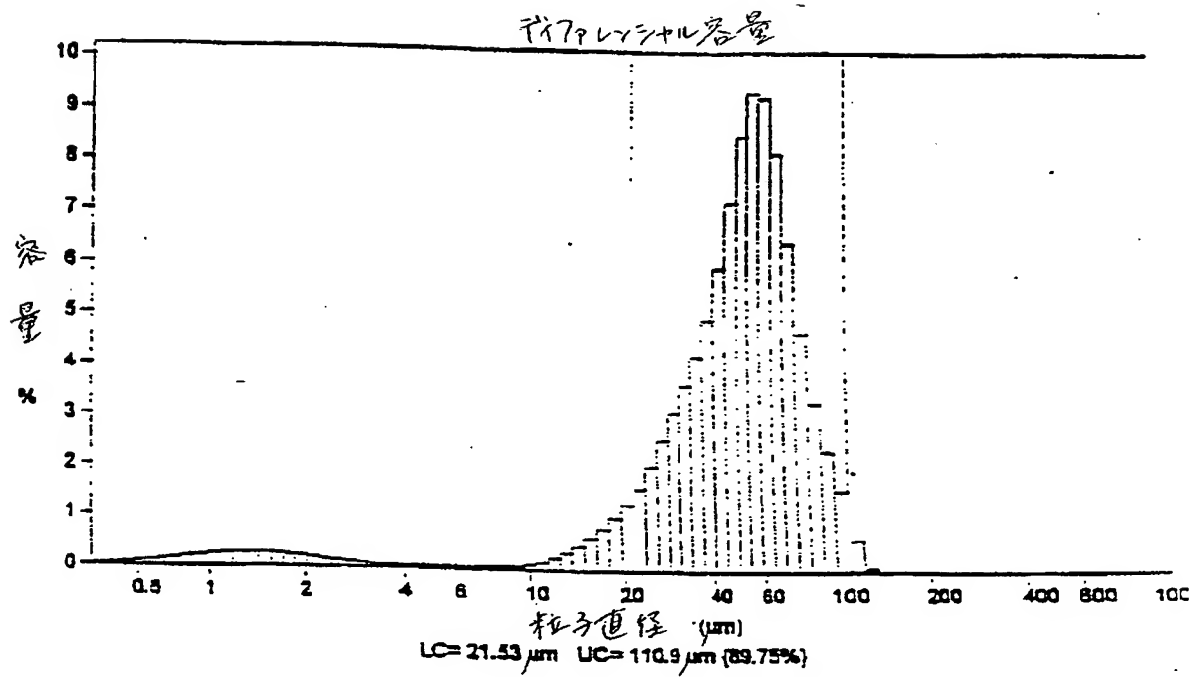
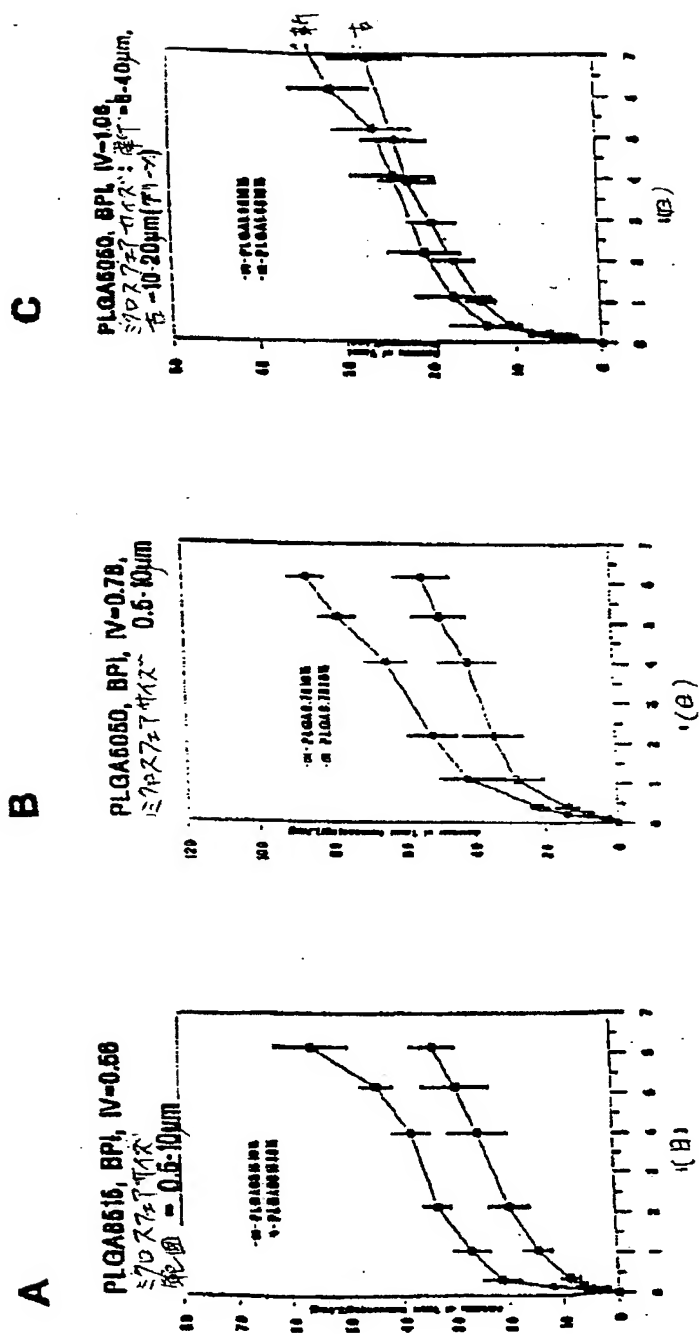
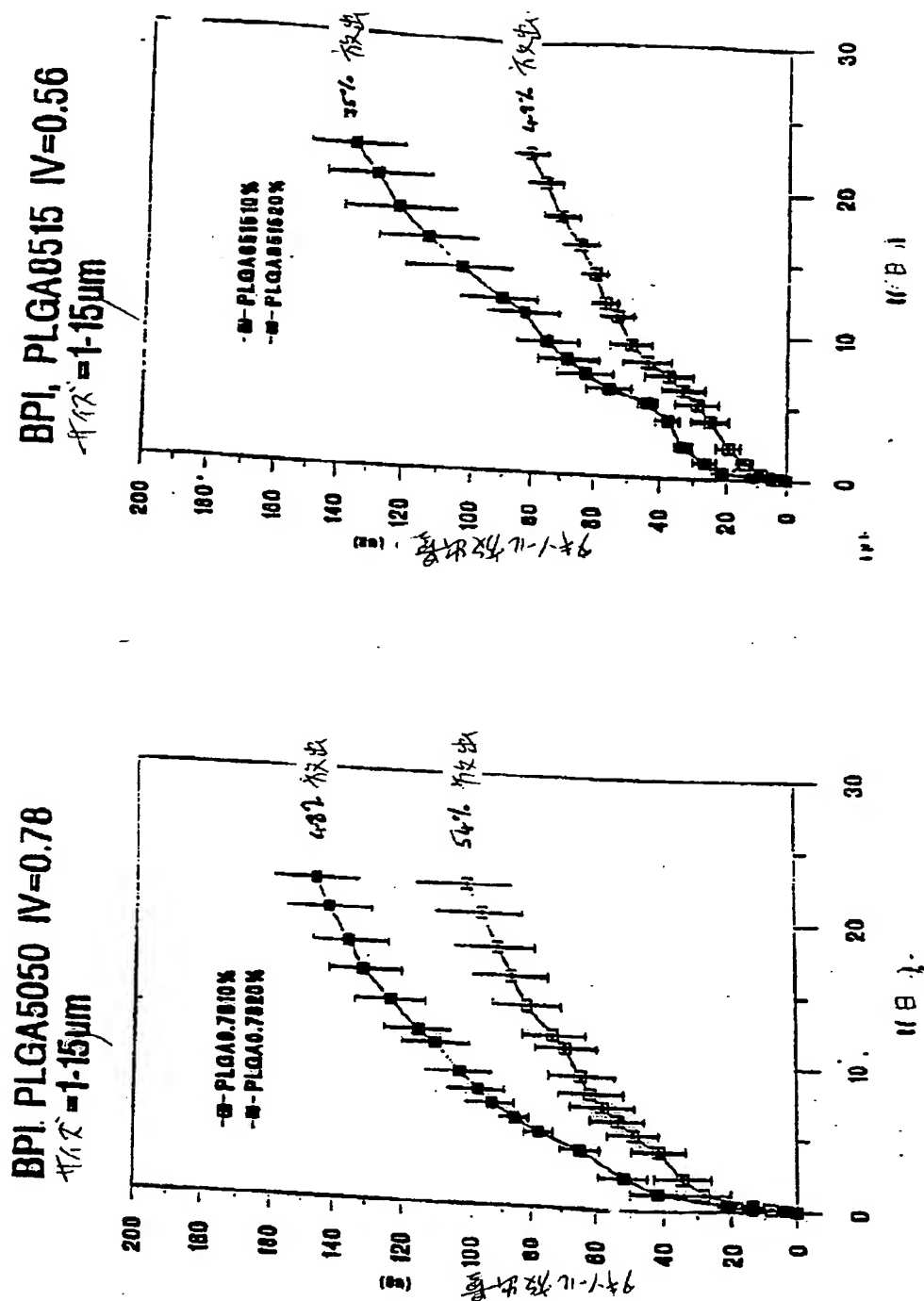


FIGURE 58A-58C



【図59】

FIGURE 59A-59B



【図60】

FIGURE 60A

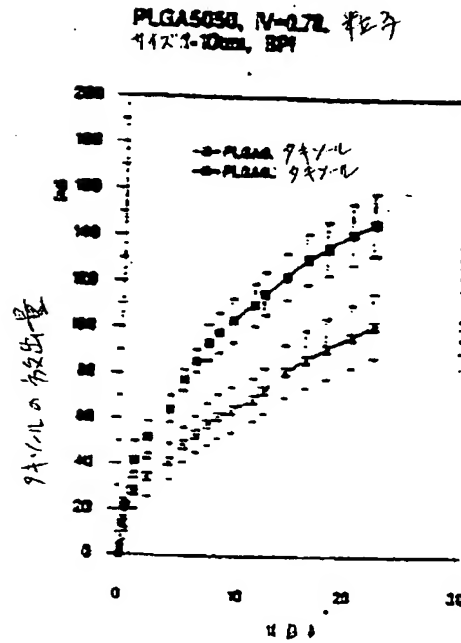
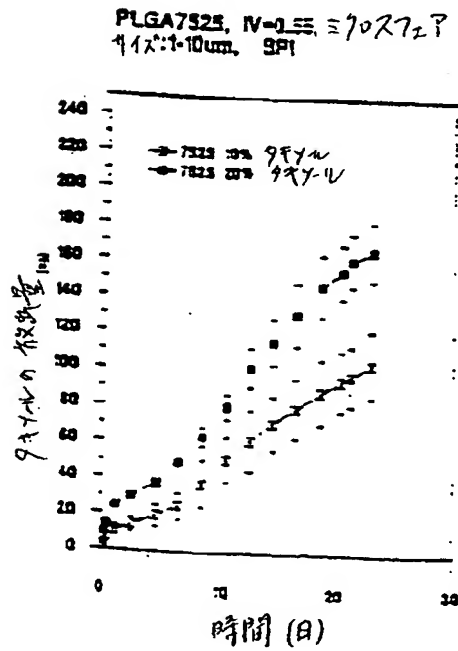


FIGURE 60B



【図61】

FIGURE 61A

PLGA5050,  $N=0.74$   $\approx 70\% \sim 75\%$   
 粒径:  $1-10\mu m$ , BPI

A

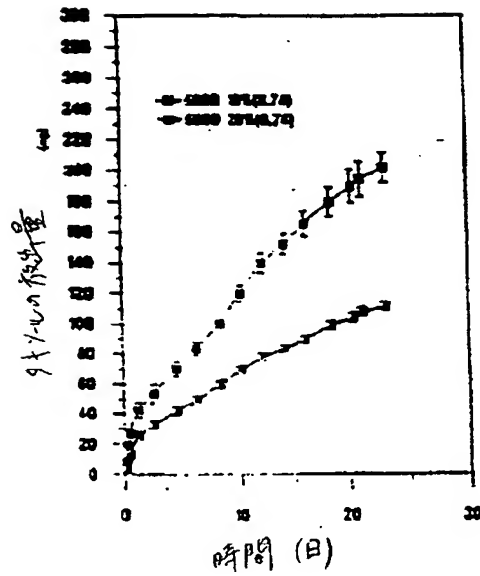
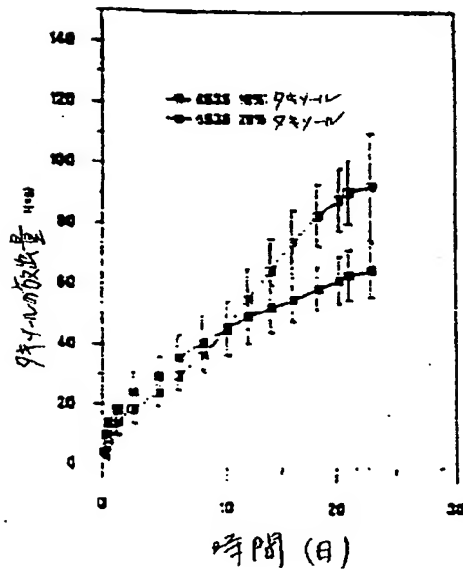


FIGURE 61B

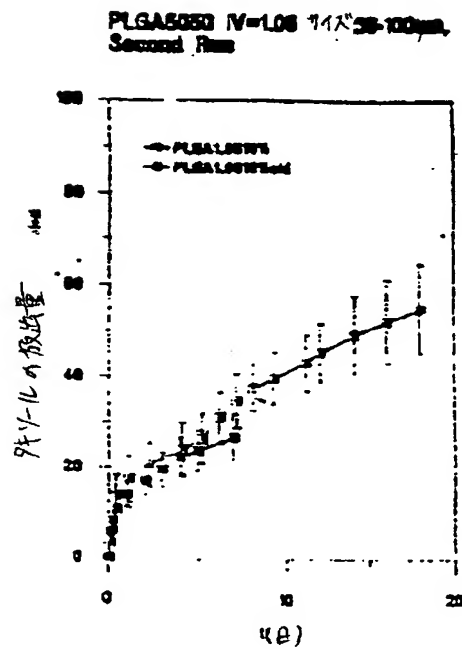
PLGA535,  $N=0.55$   $\approx 70\% \sim 75\%$  粒径:  
 $1-10\mu m$ , BPI

B



【図61】

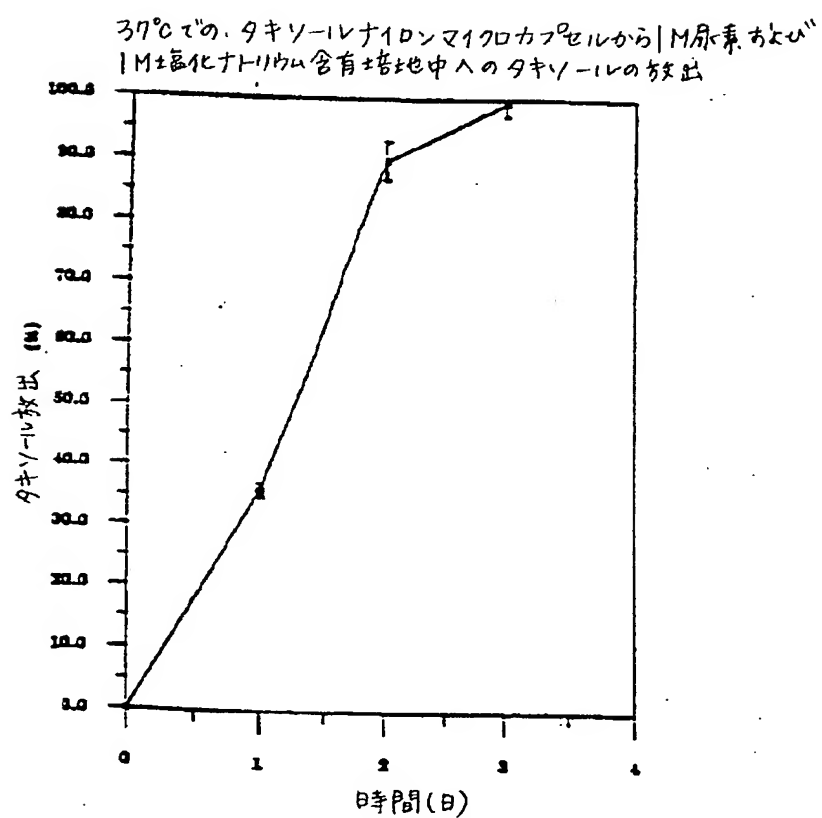
FIGURE 61C





【図62】

FIGURE 62



【図63】

FIGURE 63A

膀胱組織における  
フィブリンコートした  
PLLAミクロスフェア



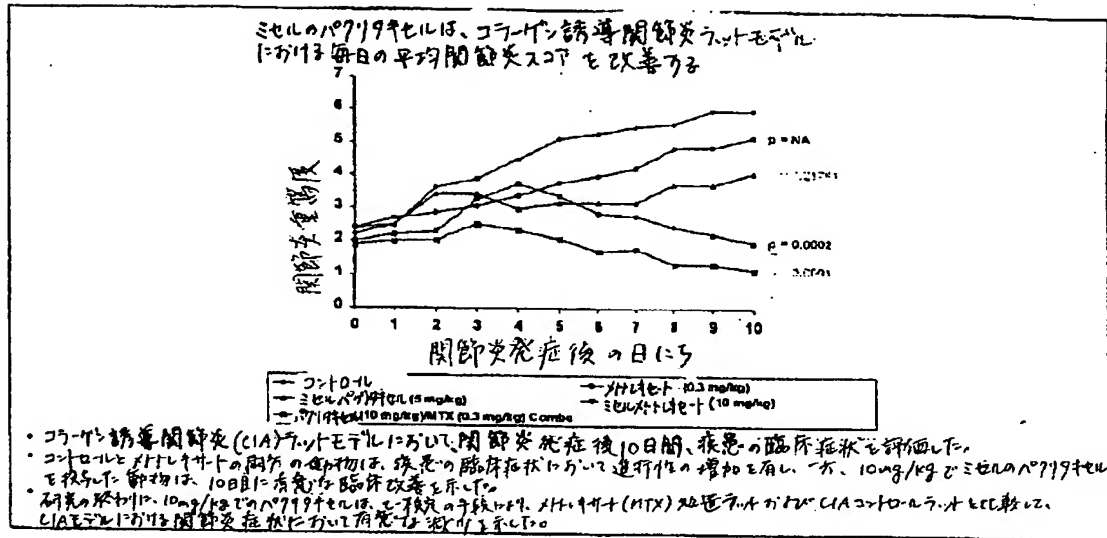
FIGURE 63B

膀胱組織における  
ポリ(レ-リニン)  
ミクロスフェア



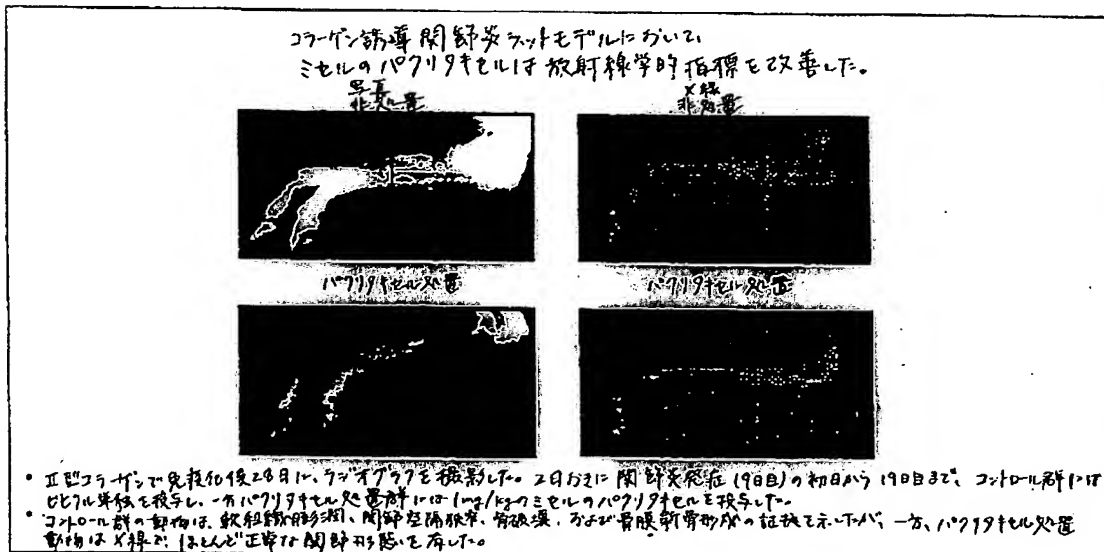
【図64】

FIGURE 64



【図65】

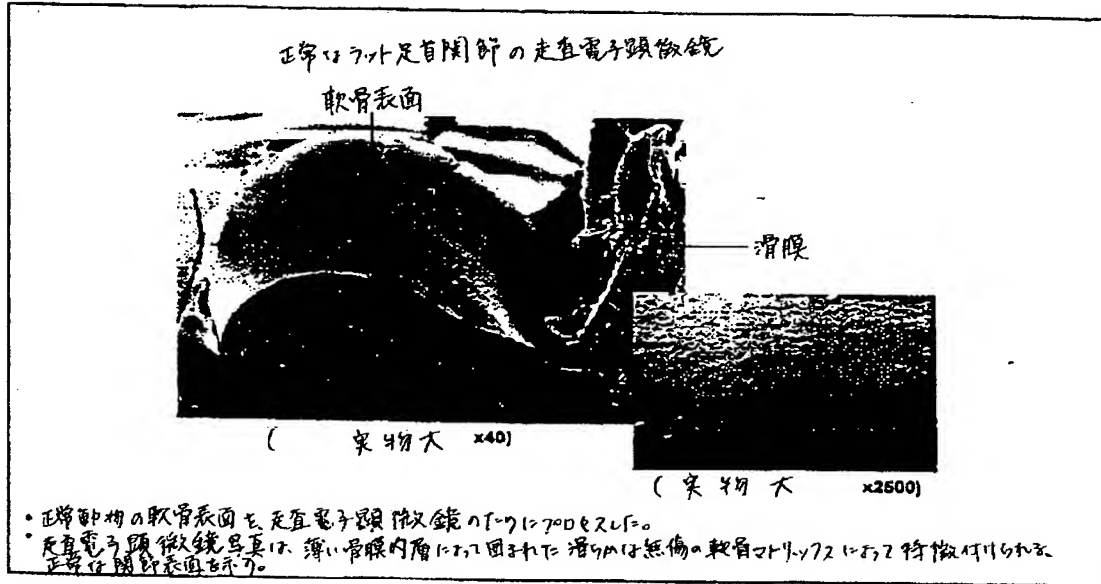
FIGURE 65



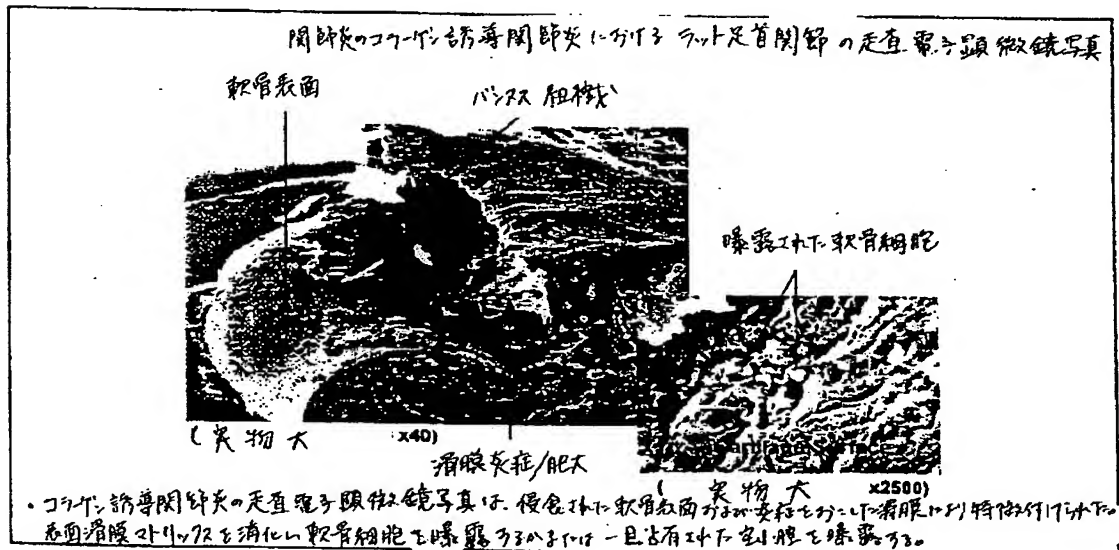
【図66】

FIGURE 66

A.



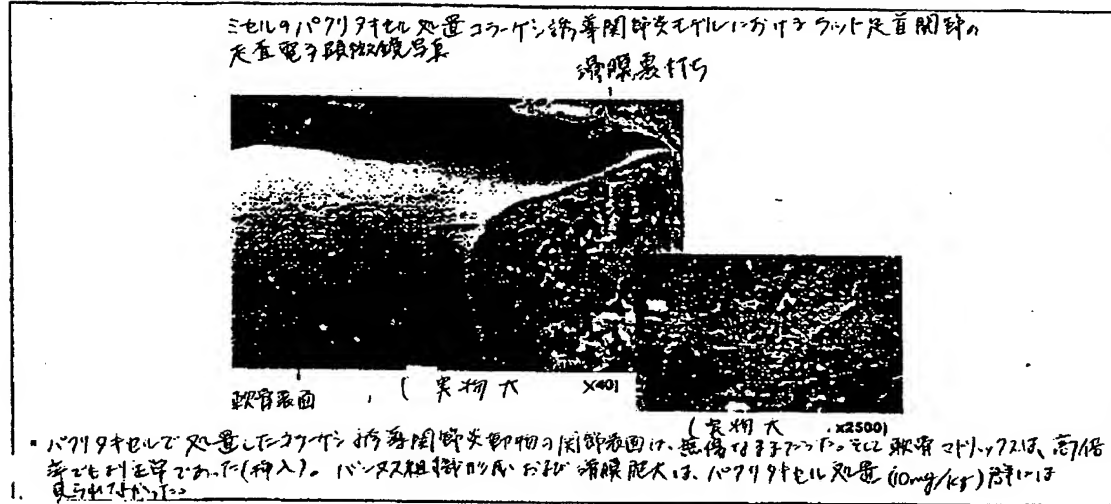
B.



【図66】

FIGURE 66

C.



【図67】

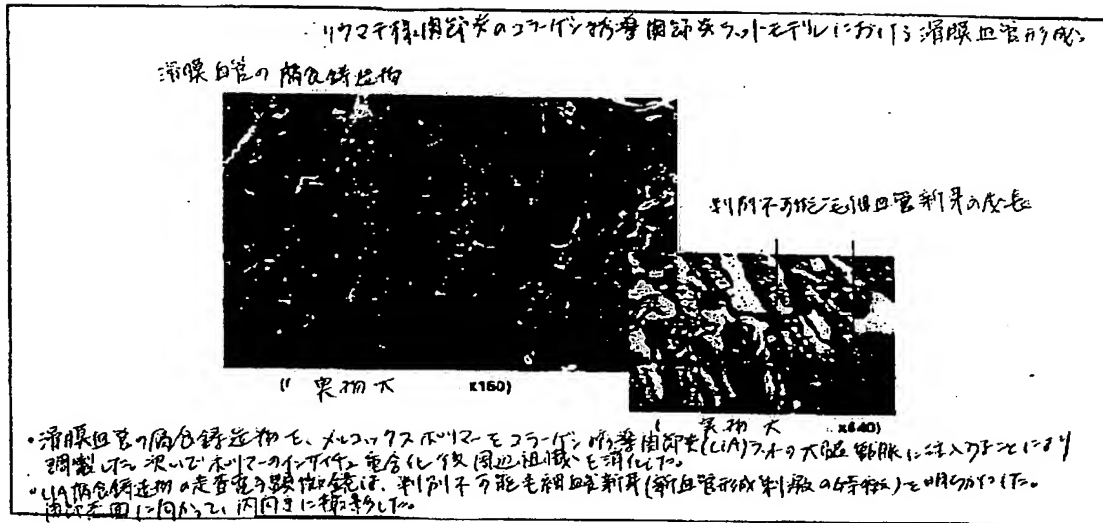
FIGURE 67



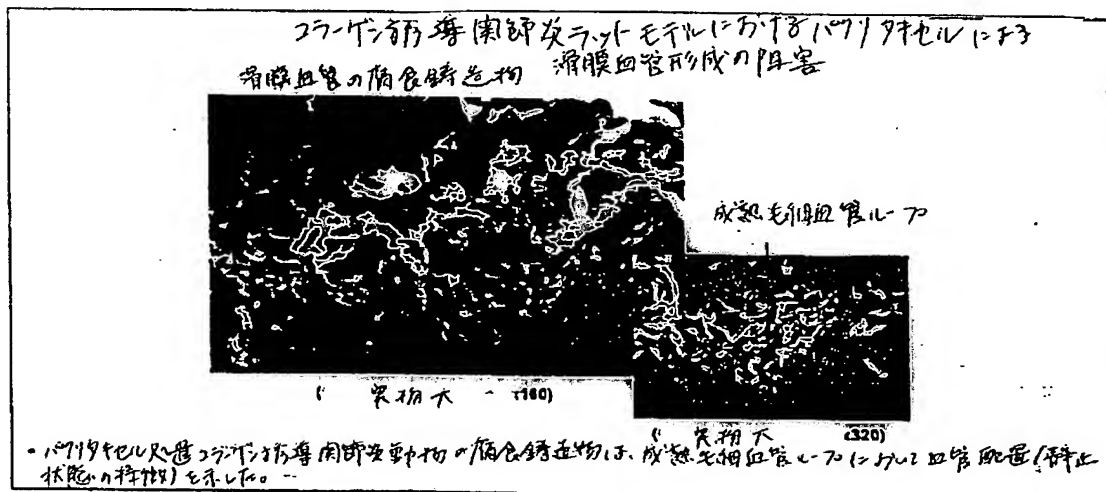
【図68】

## FIGURE 68

A.

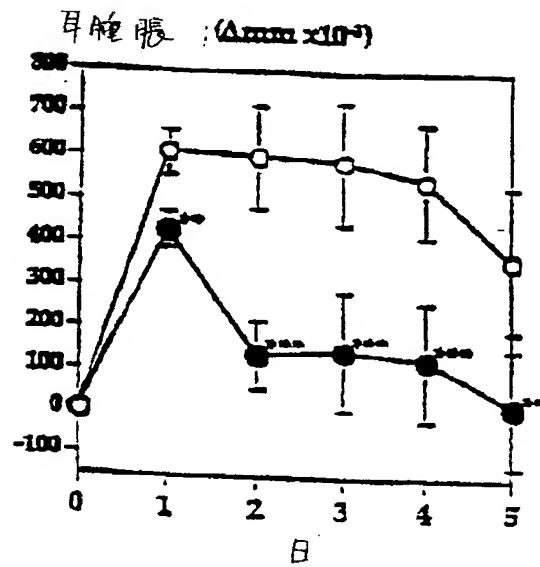


B.



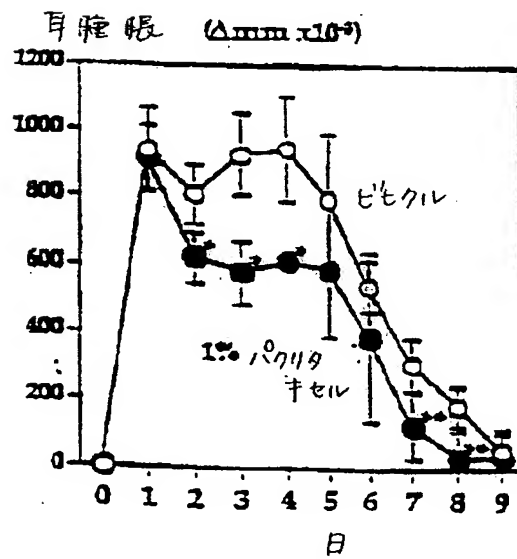
【図69】

FIGURE 69



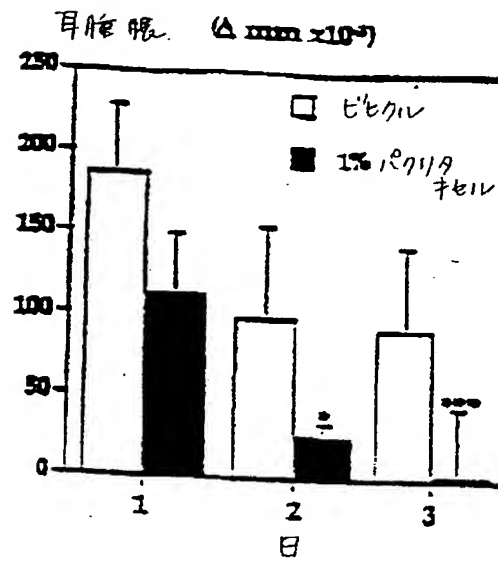
【図70】

FIGURE 70



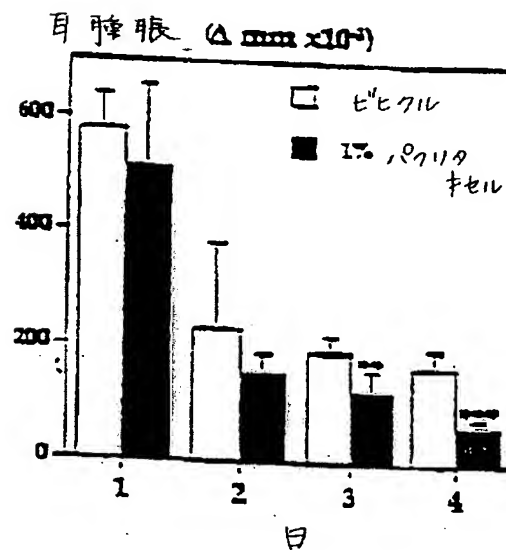
【図71】

FIGURE 71



【図72】

FIGURE 72





【図73】

FIGURE 73

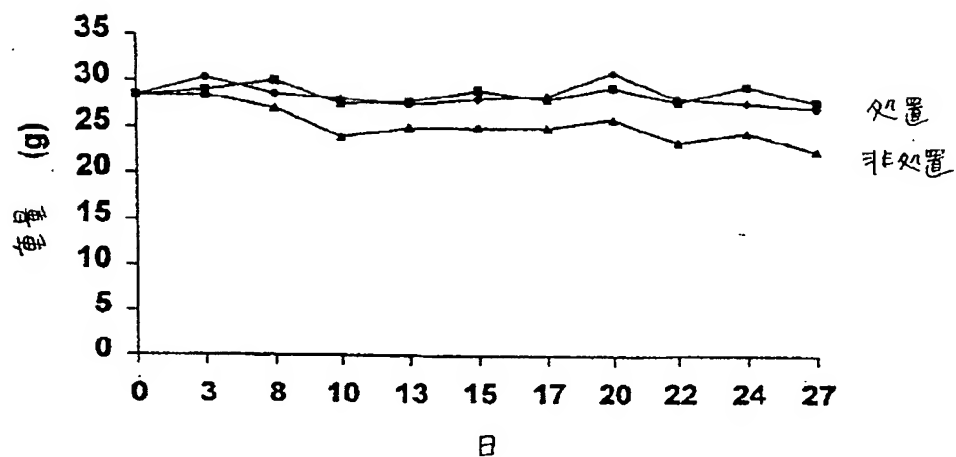


左耳  
ビビクル単独  
での局所的処置

右耳  
1%の局所的  
パルサキセル  
処置物での前処理

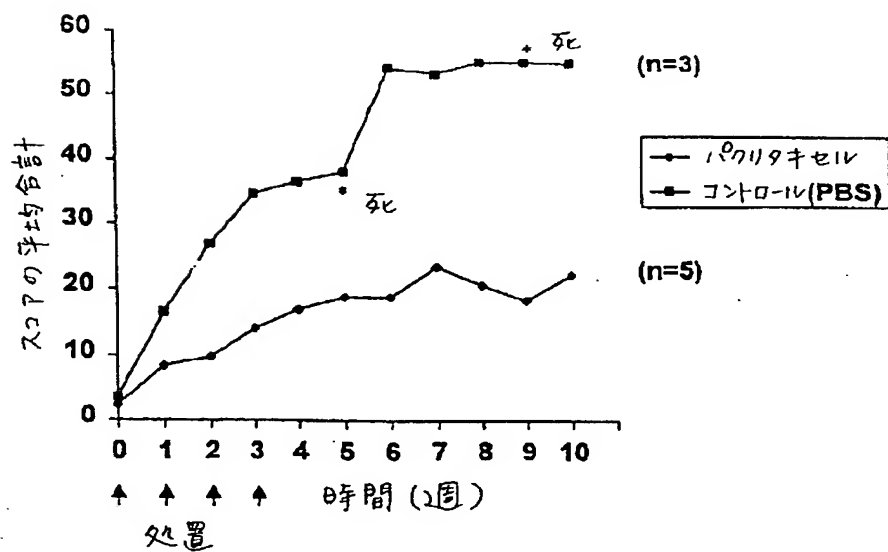
【図74】

FIGURE 74



【図75】

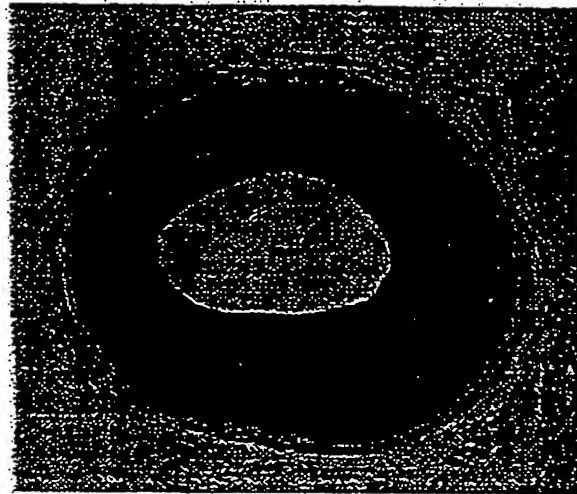
FIGURE 75



【図76】

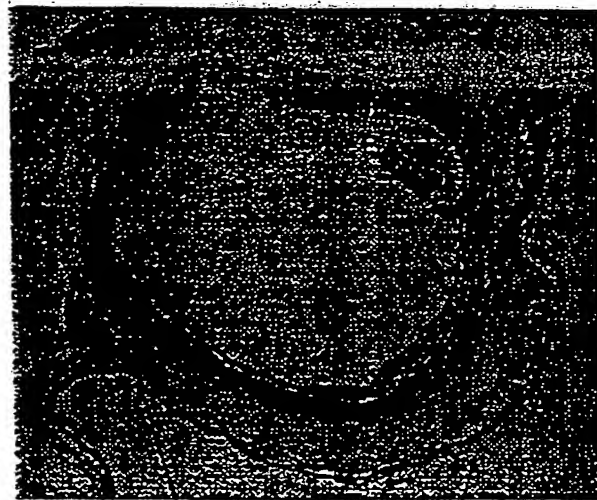
# FIGURE 76

A. 非処置



新内膜過形成  
(損傷後14日目)

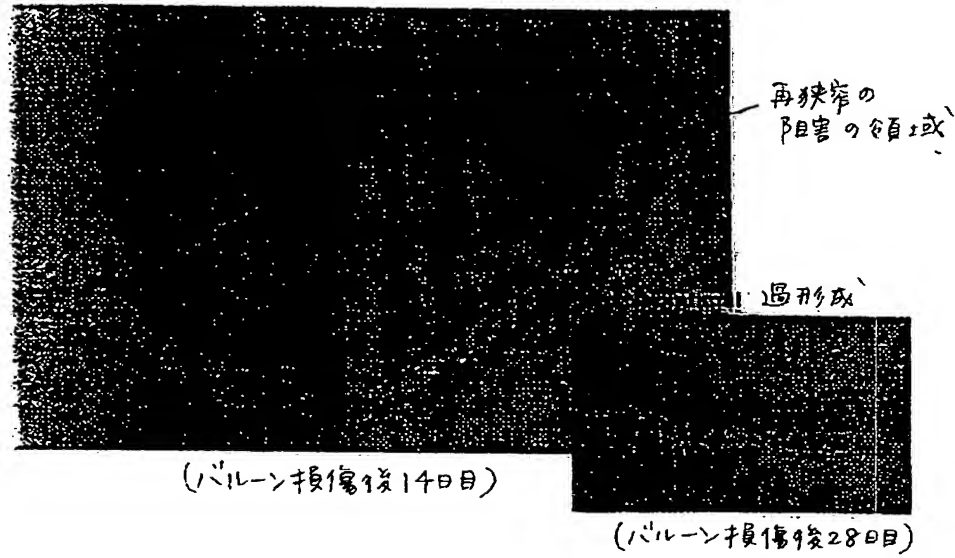
B. パクリタキセルをロードしたペースト



外膜に適用したペースト  
(損傷後14日目)

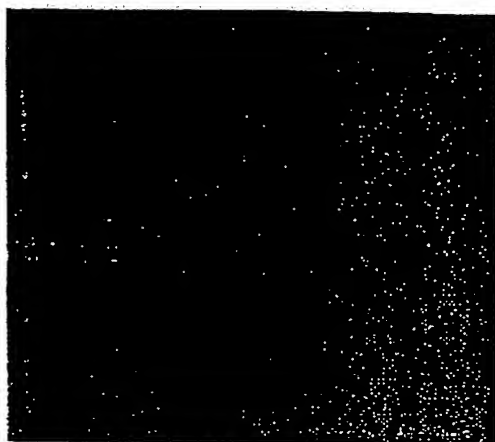
【図77】

FIGURE 77

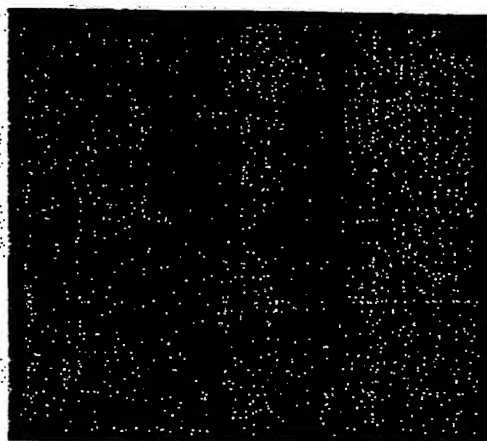


【図78】

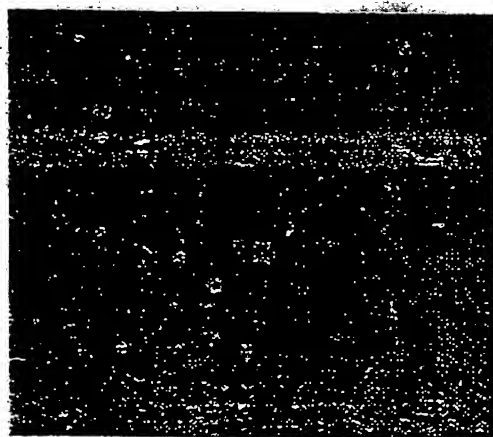
FIGURE 78



正常なマウス



トランスジェニック  
コントロール

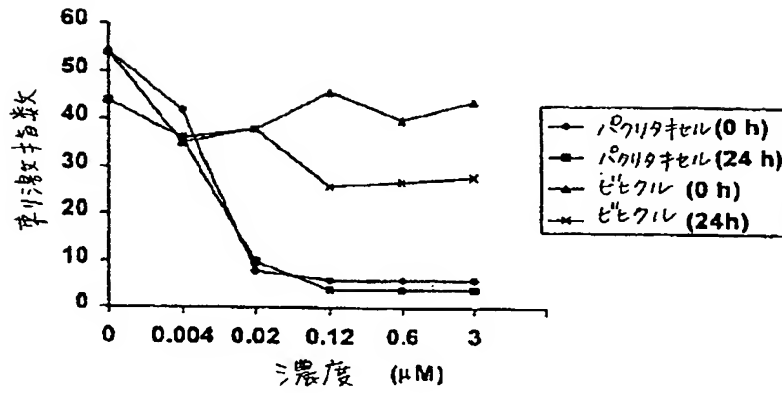


トランスジェニック  
(パクリタキセル処置)

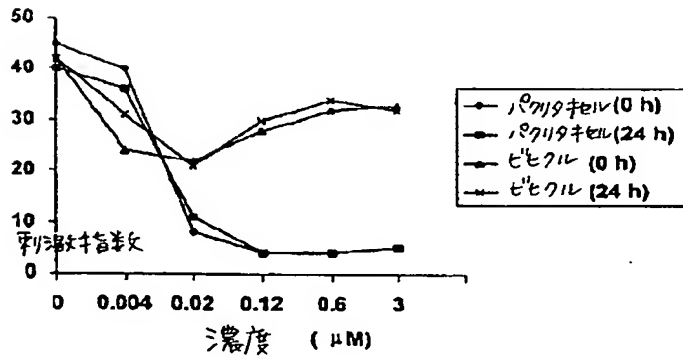
【図79】

FIGURE 79

## A. RT-1 + GP68-88

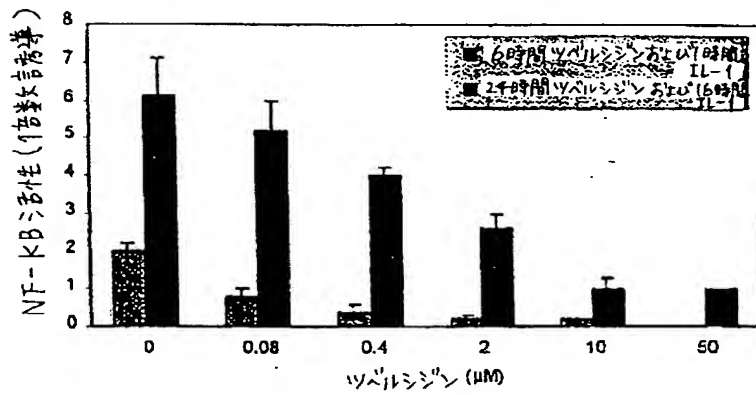


## B. RT-1 + ConA

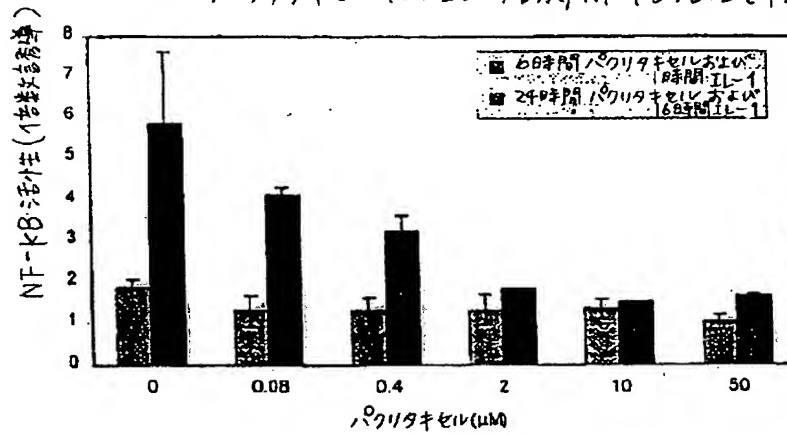


【図80】

FIGURE 80

ツベルシジンとは、IL-1誘導NF- $\kappa$ B活性を阻害する

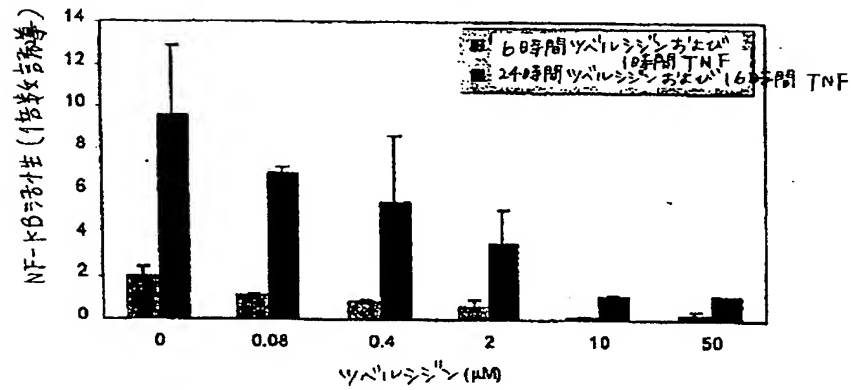
A.

パクリタキセルとは、IL-1誘導NF- $\kappa$ B活性を阻害する

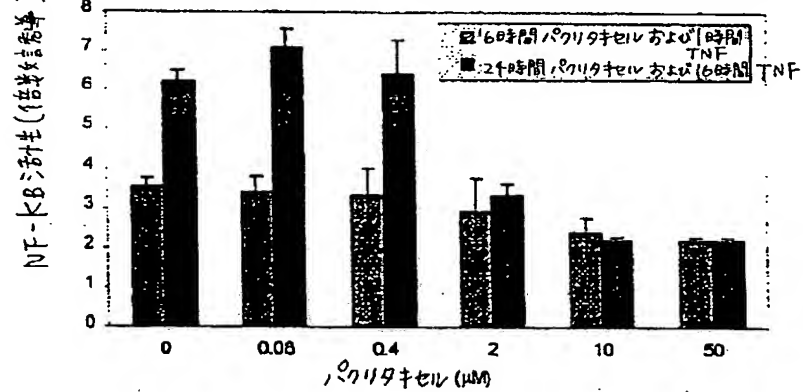
B.

【図80】

FIGURE 80

ツベルシジン は、TNF 誘導 NF- $\kappa$ B 活性を阻害する

C.

バクリタキセル は、TNF 誘導 NF- $\kappa$ B 活性を阻害する

D.



【図81】

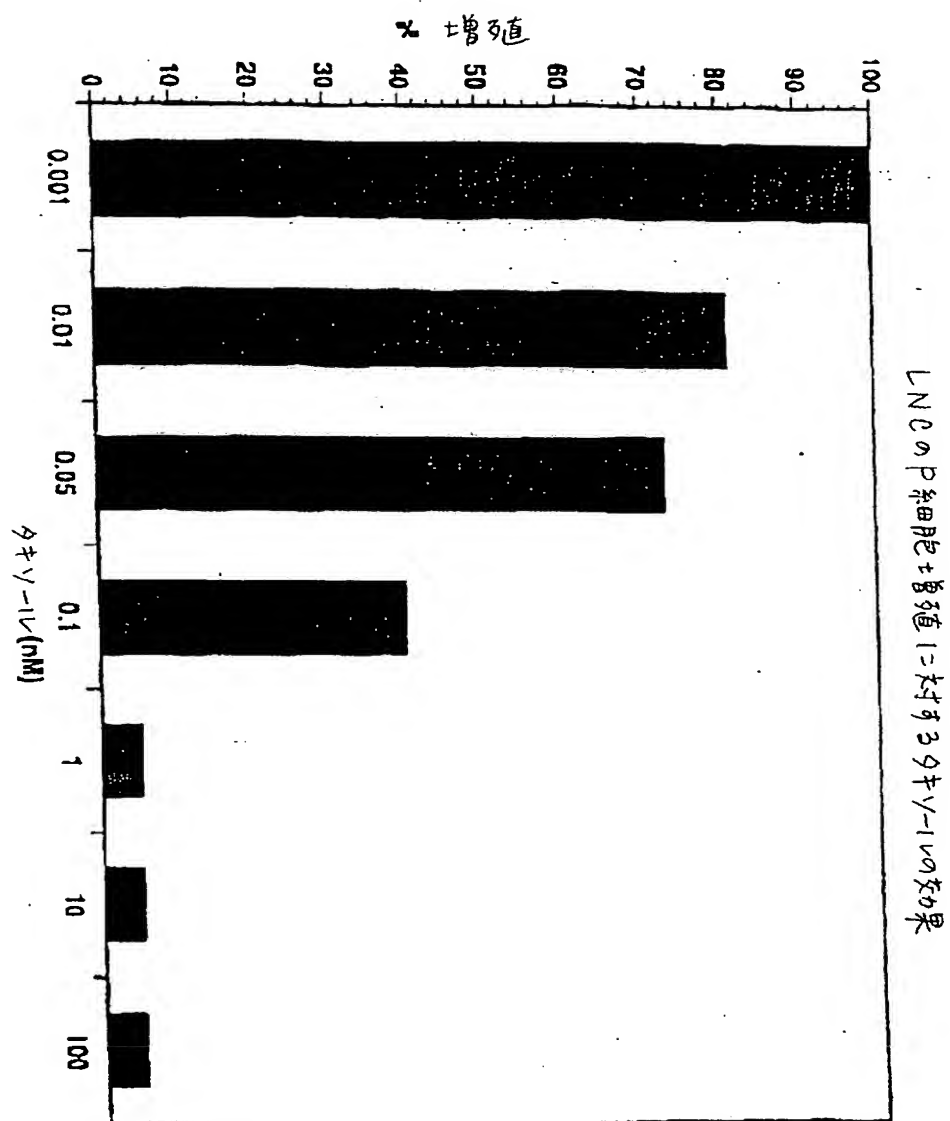
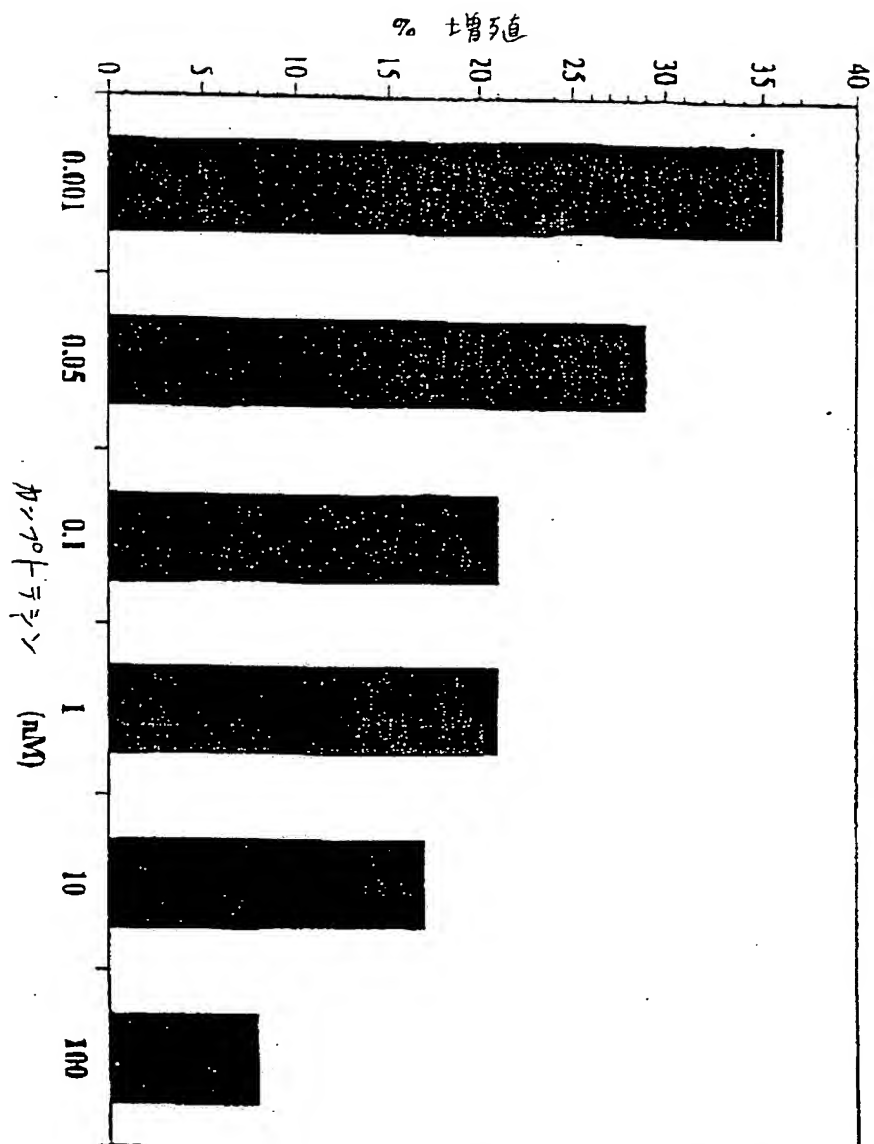


FIGURE 81A

LNCA細胞増殖に対するカンチナミンの効果



【図81】

FIGURE 81B

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No. PCT/CA 97/00910	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K31/335 A61K33/08 A61K33/16 A61K31/22 A61K31/425 A61K31/36 A61K31/70	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	EP 0 288 794 A (MERREL DOW PHARMACEUTICALS INC.) 2 November 1988 see page 1, line 14 - line 17 see page 1, line 37 - line 39 see page 7, line 4 - line 57 see page 8, line 55 - page 9, line 1
Y	---
X	EP 0 262 681 A (SCHERING CORPORATION) 6 April 1988 see page 2, line 15 - line 16 see page 2, line 26 - line 28 see claim 6
X	US 5 565 439 A (GARY A. PIAZZA ET AL.) 15 October 1996 see column 2, line 23 - line 39 --- -/--
	Relevant to claim No.
	1
	25-32
	4-6
	4,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
<sup>a</sup> Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 14 April 1998	Date of mailing of the international search report 23.07.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Alvarez Alvarez, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CA 97/00910

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 717 041 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 19 June 1996 see column 6, line 51 - column 7, line 5	4
Y	---	25-32
X	EP 0 038 567 A (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 28 October 1981 see page 1, line 8 - page 2, line 14 see claims 1-9	7,8
Y	---	25-32
Y	WO 94 12158 A (ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS INC.) 9 June 1994 see claims 1-6	25-31
Y	---	
Y	DATABASE WPI Week 8619 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 86-123250 XP002062018 & JP 61 063 613 A (MITSUI TOATSU CHEM. INC.), 1 April 1986 see abstract	25,26, 29,32
Y	---	
Y	WO 95 03795 A (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (USA) ET AL.) 9 February 1995 see page 6, line 30 - page 7, line 2 see page 9, line 26 - page 10, line 4 see page 11, line 7 - line 15 see examples 1,2 see page 18, line 10 - line 24 see page 20, line 4 - line 24	10-15, 25,27-30
Y	---	
Y	US 5 443 458 A (ROBERT P. EURY) 22 August 1995 see the whole document	10-15, 25,27-30
Y	---	
Y	YA MIN WANG ET AL.: "Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for targeted delivery of a novel anticancer agent, taxol" CHEM. PHARM. BULL., vol. 44, no. 10, 1996, pages 1935-1940, XP000633466 see discussion see abstract	25-30,32
A	---	
A	WO 95 35095 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT CO. OF THE HEBREW UNIV. JERUSALEM ET AL.) 28 December 1995 see claims 1,6	33
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA 97/ 00910

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-34  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Use of antimicrotubule agents in the treatment of multiple sclerosis, psoriasis, arthritis and stenosis and pharmaceutical forms.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see continuation ISA/210

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3 completely and 25-34 partially

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ CA 97/00910

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

GROUP 1	claims	1 - 3	completely and 25-34 partially
GROUP 2	claims	4 - 6	completely and 25-34 partially
GROUP 3	claims	7 - 9	completely and 25-34 partially
GROUP 4	claims	10 - 15	completely and 25-34 partially
GROUP 5	claims	16 - 17	completely and 25-34 partially
GROUP 6	claims	18 - 19	completely and 25-34 partially
GROUP 7	claims	20 - 21	completely and 25-34 partially
GROUP 8	claims	22 - 24	completely and 25-34 partially

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 97/00910

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 288794 A	02-11-88	US 4904697 A	27-02-90
		AT 106723 T	15-06-94
		AU 599220 B	12-07-90
		AU 1416488 A	13-10-88
		DE 3889970 D	14-07-94
		DE 3889970 T	06-10-94
		DK 192188 A	10-10-88
		JP 2603099 B	23-04-97
		JP 63267749 A	04-11-88
		ZA 8802391 A	23-09-88
EP 262681 A	06-04-88	US 4808610 A	28-02-89
		AU 603837 B	29-11-90
		AU 8071287 A	21-04-88
		CA 1294877 A	28-01-92
		DK 295088 A	31-05-88
		EP 0318522 A	07-06-89
		FI 891552 A	31-03-89
		HK 102593 A	08-10-93
		IE 60492 B	27-07-94
		JP 6043317 B	08-06-94
		JP 2500976 T	05-04-90
		KR 9310585 B	30-10-93
		MX 9203395 A	01-07-92
		NO 175350 B	27-06-94
		OA 9034 A	31-03-91
		WO 8802257 A	07-04-88
US 5565439 A	15-10-96	NONE	
EP 717041 A	19-06-96	AU 4035595 A	20-06-96
		CA 2163837 A	14-06-96
		JP 8208636 A	13-08-96
EP 38567 A	28-10-81	GB 2074858 A	11-11-81
		AU 553680 B	24-07-86
		AU 6971081 A	29-10-81
		BE 888525 A	22-10-81
		CA 1172168 A	07-08-84
		CH 654316 A	14-02-86

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 97/00910

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 38567 A		DE 3116029 A	18-03-82
		DE 3176462 A	29-10-87
		DK 179781 A	24-10-81
		JP 1765106 C	11-06-93
		JP 4028686 B	15-05-92
		JP 56166118 A	21-12-81
		NL 8101987 A	16-11-81
		ZA 8102640 A	29-12-82
-----		-----	-----
WO 9412158 A	09-06-94	AU 670168 B	04-07-96
		AU 5683594 A	22-06-94
		AU 6802996 A	19-12-96
		CA 2150803 A	09-06-94
		EP 0674506 A	04-10-95
		JP 8503950 T	30-04-96
		US 5654010 A	05-08-97
		US 5667808 A	16-09-97
-----		-----	-----
WO 9503795 A	09-02-95	AU 7476894 A	28-02-95
		EP 0711158 A	15-05-96
		JP 9503493 T	08-04-97
		US 5616608 A	01-04-97
-----		-----	-----
US 5443458 A	22-08-95	NONE	
-----		-----	-----
WO 9535095 A	28-12-95	US 5540934 A	30-07-96
		AU 2977695 A	15-01-96
		EP 0804160 A	05-11-97
		US 5716638 A	10-02-98
-----		-----	-----



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 K 31/4015		A 6 1 K 31/4015	
31/427		31/427	
31/4433		31/4433	
31/7064		31/7064	
33/00		33/00	
33/16		33/16	
47/32		47/32	
47/34		47/34	
A 6 1 M 25/00	4 2 0	A 6 1 M 25/00	4 2 0 Z
29/02		29/02	
A 6 1 P 1/00		A 6 1 P 1/00	
9/00		9/00	
11/00		11/00	
25/00		25/00	
29/00		29/00	
37/00		37/00	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, F I, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, M X, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**